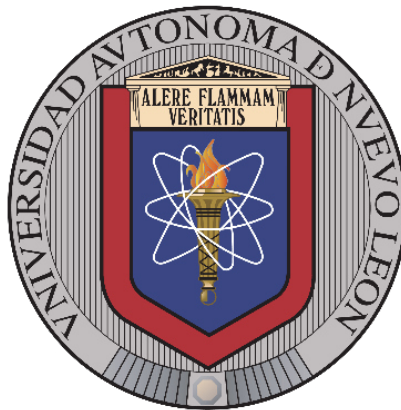


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

**DEGRADACIÓN DE ÉMBOLO DE ÁCIDO HIALURÓNICO TRAS LA
APLICACIÓN EXTRAVASCULAR DE HIALURONIDASA**

PRESENTA

M.C.P. YOLANDA SALINAS ÁLVAREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

AGOSTO, 2018

**DEGRADACIÓN DE ÉMBOLO DE ÁCIDO HIALURÓNICO TRAS LA
APLICACIÓN EXTRAVASCULAR DE HIALURONIDASA**

Aprobación de Tesis:



DR. MED. SANTOS GUZMÁN LÓPEZ

Director de Tesis



DR. C. RODRIGO ENRIQUE ELIZONDO OMAÑA

Co-Director de Tesis



DR. C. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ

Miembro de la Comisión de Tesis



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

DEGRADACIÓN DE ÉMBOLO DE ÁCIDO HIALURÓNICO TRAS LA APLICACIÓN EXTRAVASCULAR DE HIALURONIDASA

Presentado por:

M.C.P. Yolanda Salinas Álvarez

Este trabajo se realizó en el Departamento de Anatomía Humana y en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Dr. med. Santos Guzmán López y la co-dirección del Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña y el Dr. C. Adolfo Soto Domínguez como miembro de la comisión.

FIRMAS

Director de Tesis



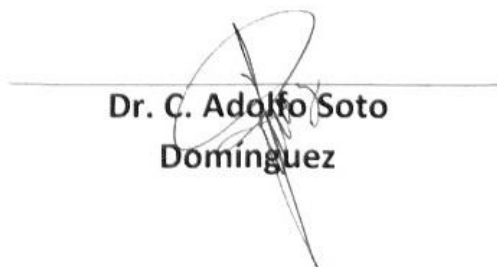
Dr. med. Santos Guzmán López

Co- Director de Tesis



**Dr. C. Rodrigo Enrique
Elizondo Omaña**

Comisión de Tesis



**Dr. C. Adolfo Soto
Domínguez**

DEDICATORIA

Para mi familia y amigos con amor:

Mamá, por tu amor, ejemplo, esfuerzo y apoyo incondicional. Todos mis logros son gracias a ti. Te admiro mamá. Las dos siempre unidas.

Tita, por tu amor, apoyo y oraciones cuando hubo tiempos difíciles. Por tus chistes, cariños y consejos. Eres una abuelita única.

Toño, por tu amor y tu increíble forma de demostrármelo, tu inmensa paciencia y tu ayuda siempre. Me haces querer ser mejor siempre. Te amo.

Este logro es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme salud, fuerza y entendimiento para lograr esta meta propuesta hace dos años.

A mi mamá, por darme su apoyo incondicional, por su preocupación, trabajo y amor. Por su esfuerzo siempre.

A mi abuelita, por escucharme, apoyarme y aconsejarme. Por sus oraciones cuando estuve en momentos difíciles.

A mi papá, por sus palabras de ánimo, su interés y apoyarme desde la distancia.

A mi familia, por su apoyo, sus palabras de aliento e interés.

A Toño, mi novio, por ayudarme desde antes de comenzar la maestría, y por leer conmigo cuando no entendía. Por desvelarte conmigo estudiando, y por ayudarme con las cirugías, sujeciones y más. Por escucharme, apoyarme y tenerme tanta paciencia siempre.

A mi suegra y mi cuñada por su interés, apoyo, felicitaciones y cariño estos dos años.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Medicina donde he recibido mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de la beca de Posgrado.

Al Departamento de Anatomía Humana y al Departamento de Histología, que fueron mi segundo hogar estos dos años.

Al Dr. med. Santos Guzmán López, por su apoyo para poder realizar este proyecto, y por abrirme las puertas del que fue mi segundo hogar.

Al Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña, por invitarme a conocer el camino de la ciencia e investigación. Por su confianza puesta en mí desde el principio, y por sus comentarios y enseñanzas.

Al Dr. C. Adolfo Soto Domínguez, por su gran ayuda, por los conocimientos compartidos y por su paciencia y dedicación a este proyecto. Por sus enseñanzas en el Laboratorio de Técnicas Histológicas.

Al Dr. C. Roberto Montes de Oca, por su apoyo y sus comentarios.

Al Dr. Alejandro Quiroga, por su tiempo y trabajo realizado en el Laboratorio de Microcirugía y por compartir sus conocimientos en técnicas quirúrgicas.

A la Dra. Esperanza C. Welsh Hernández, por su gran ayuda, sus ideas y sus conocimientos que motivaron este trabajo.

Al MVZ. Gilberto Arévalo Martínez, por su paciencia y esfuerzo. Por los conocimientos y experiencias compartidas, y por enseñarme el uso, cuidado y manejo de animales de laboratorio.

A la Est. Yenni Hernández Gárate, por su esfuerzo, tiempo e interés mostrado en este el proyecto.

Al MVZ. Brayan Carranza, por su tiempo y trabajo, por los conocimientos aplicados y compartidos.

A Luis, por todos los cortes histológicos realizados. A Miriam e Iván, por su ayuda en el laboratorio de Técnicas Histológicas.

A Guille y Rocío, mis compañeras y amigas estos dos años, por vivir esta experiencia juntas, por el apoyo en momentos de estrés. Por los momentos de risa y diversión. Sin ustedes esta experiencia no hubiera sido la misma. ¡Las quiero!

A los chicos del AIA: Brenda, Adrián, Miguel, Rodrigo, Kouatzin y Hugo, por hacer de mis días en Anatomía más divertidos. Gracias por su ayuda, mi experiencia en Anatomía no hubiera sido la misma sin ustedes.

A Arelie y Valeria, por los buenos momentos, por hacer que las cosas fueran más sencillas.

A Jimmy, por su ayuda con la fotografía y la edición de las imágenes, por su paciencia para resolver los problemas tecnológicos.

A mis compañeros de Maestría, por coincidir y hacer esta experiencia única. A Sara y Vale, por su confianza y los momentos divertidos. A Yareth, por hacer más agradables mis días de trabajo en el laboratorio de Técnicas Histológicas, por las largas charlas.

A mis amigas y amigos que tuvieron la paciencia, entendieron mis tiempos y me dieron palabras de apoyo siempre que lo necesité.

¡Gracias!

RESUMEN

YOLANDA SALINAS ÁLVAREZ

Fecha de graduación: Agosto 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina.

**Título del Estudio: DEGRADACIÓN DE ÉMBOLO DE ÁCIDO HIALURÓNICO
TRAS LA APLICACIÓN EXTRAVASCULAR DE HIALURONIDASA.**

Número de páginas:

Área de estudio: Morfología

**Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en
Morfología.**

El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano presente en la matriz extracelular. Debido a su vida media corta ha sido entrecruzado con diversas sustancias como el 1,4-butanodiol diglicidil éter para incrementar su durabilidad y ser utilizado de forma clínica como relleno facial temporal, o en el tratamiento de osteoartritis de extremidades inferiores. Una de las complicaciones más impactantes de su aplicación como relleno facial es la oclusión vascular, ya que deja lesiones y cicatrices permanentes en la cara. Se ha evaluado el uso de la hialuronidasa aplicada de forma intraarterial y subcutánea; sin embargo, no se han comparado entre sí distintas dosis, ni se ha evaluado la seguridad para los tejidos adyacentes posterior a su aplicación. En este trabajo se estableció un modelo lagomorfo de embolismo en la arteria femoral con mayor similitud al sitio de aplicación clínica que los ya existentes, para posteriormente evaluar el efecto de la aplicación subcutánea de hialuronidasa a dosis baja (75UI), media (200UI) y alta (500UI) en este modelo. A pesar de la persistencia del ácido hialurónico en la luz arterial de los grupos tratados, se encontró una diferencia significativa entre el grupo de 200UI y 500UI de hialuronidasa y el grupo control

de embolismo. Se observaron sitios de trombosis arterial. Al evaluar los tejidos circundantes, el músculo y el tejido adiposo del grupo tratado con dosis alta presentó menor lisis muscular y menor cantidad de infiltrado inflamatorio.

Contribuciones y Perspectivas

Se estableció un modelo lagomorfo de embolismo por ácido hialurónico, además se reporta que con una dosis alta de hialuronidasa, aplicada de forma subcutánea, se evitan parcialmente los daños causados por el embolismo. Se propone el empleo de terapia trombolítica combinada con el uso de dosis mayores de hialuronidasa subcutánea en este modelo.

Director de Tesis

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
*	Diferencia estadísticamente significativa
≤	Menor o igual que
®	Marca registrada
°C	Grados centígrados
µm	Micrómetros
cm	Centímetro
FDA	Food and Drug Administration
Fig.	Figura
G	Gauge
h	Hora(s)
HA	Ácido hialurónico
HYAL	Hialuronidasa
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
IA	Intraarterial
mg/kg	Miligramos/kilogramo
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
PBS	Buffer de fosfato salino
pH	Potencial de Hidrógeno
s	Segundo(s)
SC	Subcutánea
UI	Unidades internacionales
VO	Vía oral

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

- Fig. 1** **Oclusión vascular por relleno de HA.**
- Fig. 2** **Abordaje Quirúrgico.**
- Fig. 3** **Sitios de aplicación SC de HYAL.**
- Fig. 4** **La técnica histológica convencional no elimina el HA entrecruzado.**
- Fig. 5** **El modelo de embolismo por HA en oreja de conejo no tiene similitud con el sitio de aplicación clínica.**
- Fig. 6** **El modelo de embolismo femoral por HA presenta cambios macroscópicos.**
- Fig. 7** **El grupo Control de Embolismo presenta mayores cambios en comparación con los grupos Control Sano y Quirúrgico.**
- Fig. 8** **El embolismo por HA causa obstrucción de la luz arterial.**
- Fig. 9** **El embolismo por HA causa cambios estructurales en la pared arterial.**
- Fig. 10** **Confirmación de los cambios estructurales en la pared arterial ocasionados por el embolismo.**
- Fig. 11** **El embolismo por HA causa cambios morfológicos en las fibras elásticas de la pared arterial.**
- Fig. 12** **Identificación de HA en la luz arterial del grupo Control de Embolismo.**
- Fig. 13** **Una Dosis alta de HYAL previene los cambios macroscópicos ocasionados por el embolismo.**
- Fig. 14** **El grupo de embolismo tratado con Dosis Alta (500UI HYAL) presenta una ligera disminución del émbolo.**

- Fig. 15** Los grupos de embolismo tratados con Dosis Media y Alta (200UI y 500UI HYAL) no presentan cambios estructurales en la pared arterial.
- Fig.16** Las fibras elásticas de la pared arterial de los grupos de embolismo tratados con HYAL preservan su morfología normal.
- Fig. 17** Confirmación de la mejoría parcial de la pared arterial de los grupos de embolismo tratados con Dosis Media y Alta (200UI y 500UI HYAL).
- Fig. 18** El grupo de embolismo tratado con Dosis Alta (500UI HYAL) presenta menor cantidad de HA en la luz arterial.
- Fig. 19** El grupo de embolismo tratado con Dosis Alta (500UI HYAL) evita parcialmente el daño en los tejidos adyacentes a la arteria.
- Fig. 20** La Dosis Alta (500UI HYAL) evita parcialmente el daño al músculo esquelético ocasionado por el embolismo.
- Fig. 21** Confirmación del efecto de una Dosis Alta (500UI HYAL) en un modelo de embolismo al evitar parcialmente los daños sobre el músculo esquelético ocasionados por el embolismo.
- Fig. 22** La aplicación de HYAL (500UI) SC altera la morfología normal de la piel.
- Fig. 23** La HYAL (500UI) SC no causa cambios morfológicos en los tejidos de una extremidad sana.

LISTA DE TABLAS

TABLA

- Tabla 1. Distribución de grupos experimentales y sus características metodológicas.**
- Tabla 2. Dosis de HYAL SC.**
- Tabla 3. Tabla semicuantitativa de hallazgos clínicos al 4° día posterior al abordaje quirúrgico.**
- Tabla 4. Tabla semicuantitativa de hallazgos clínicos de grupos control y tratados con HYAL al 4° día posterior al abordaje quirúrgico.**
- Tabla 5. Análisis estadístico de la cuantificación de HA.**

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA

- Gráfica 1.** Los grupos de embolismo tratados con Dosis Media y Alta (200UI y 500UI HYAL) presentan menor cantidad de HA en comparación con los grupos Control de Embolismo y de embolismo tratado con Dosis Baja (75UI HYAL).

CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1.1 ÁCIDO HIALURÓNICO Y HIALURONIDASA.....	1
1.1.2 ANTECEDENTES	4
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	6
1.3 HIPÓTESIS	6
1.4 OBJETIVO GENERAL	6
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
CAPÍTULO 2.....	7
2.1 MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
2.1.1 TIPO DE ESTUDIO, DISEÑO Y LUGAR DE REFERENCIA	7
2.1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	7
2.1.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	7
2.1.4 CUIDADO Y MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	9
2.1.5 ANESTESIA, ANALGESIA Y ANTIBIOTICOTERAPIA DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	9
2.1.6 ABORDAJE QUIRÚRGICO	9
2.1.7 EMBOLISMO POR HA	10
2.1.8 ADMINISTRACIÓN EXPERIMENTAL DE HYAL.....	11
2.1.9 DOCUMENTACIÓN CLÍNICA Y REGISTRO FOTOGRÁFICO	12
2.1.10 CRITERIOS DE PUNTO FINAL	12
2.1.11 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	12
2.1.12 ANÁLISIS MORFOLÓGICO	13
2.1.13 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE HA	13
2.1.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
CAPÍTULO 3.....	14
3.1 RESULTADOS.....	14
3.1.1 EL RELLENO FACIAL DE HA PERMANECE DESPUÉS DE LA TÉCNICA HISTOLÓGICA CONVENCIONAL.....	14
3.1.2 EI MODELO LAGOMORFO DE EMBOLISMO FEMORAL POR HA POSEE MAYOR SIMILITUD CON EL SITIO DE APLICACIÓN CLÍNICA.	15
3.1.3 ESTABLECIMIENTO DE UN NUEVO MODELO LAGOMORFO DE EMBOLISMO POR HA.	16
3.1.4 COMPARACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS GRUPOS CONTROL.....	16
3.1.5 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL MODELO DE EMBOLISMO FEMORAL LAGOMORFO Y SU COMPARACIÓN CON LOS GRUPOS CONTROL SANO Y QUIRÚRGICO.	18

3.1.6 MEJORÍA CLÍNICA PARCIAL EN GRUPO DE EMBOLISMO TRATADO CON DOSIS ALTA DE HYAL.	24
3.1.7 CAMBIOS ARTERIALES POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE HYAL.	25
3.1.8 DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LOS GRUPOS TRATADOS CON 200UI Y 500UI HYAL Y EL GRUPO DE EMBOLISMO.	30
3.1.9 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN TEJIDOS ADYACENTES POSTERIOR A LA APLICACIÓN EXTRAVASCULAR DE HYAL.	34
3.1.10 UNA DOSIS ALTA DE HYAL (500UI) APLICADA DE FORMA SC NO ALTERA LA MORFOLOGÍA DE LA PIEL.	39
3.1.11 UNA DOSIS ALTA DE HYAL (500UI) NO CAUSA CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA ARTERIA Y TEJIDOS SUBYACENTES EN UNA EXTREMIDAD SANA.	41
CAPÍTULO 4.	42
DISCUSIÓN.	42
CAPÍTULO 5.	45
CONCLUSIONES, CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS.	45
CONCLUSIONES	45
CONTRIBUCIONES.	45
PERSPECTIVAS	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	47
APÉNDICE A.	51
APÉNDICE B.	54

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1.1 ÁCIDO HIALURÓNICO Y HIALURONIDASA

El ácido hialurónico (HA) es el glucosaminoglicano más abundante en la matriz extracelular⁽¹⁾, está formado por ácido glucurónico y N-acetil D-glucosamina, no está sulfatado y por su carga negativa posee la capacidad de unir y retener moléculas de agua⁽²⁻⁴⁾. El HA se encuentra en diversos tejidos como humor vítreo, líquido sinovial, cordón umbilical y piel^(3,5). El 50% de su totalidad se encuentra en la piel, donde tiene una vida media menor a 24h^(2,6,7). La presencia de HA en la piel le confiere las propiedades de volumen e hidratación que son características de una piel joven^(2,3,8,9).

El HA comercial se obtiene de origen aviar o bacteriológico⁽¹⁰⁾, y se entrecruza con sustancias como el 1,4-butanodiol diglicidil éter para evitar su rápida degradación^(11,12). Esto permite que pueda ser utilizado en el área clínica como material de relleno facial en líneas de expresión y arrugas⁽¹⁾, donde alcanza una duración aproximada de 6 a 12 meses^(13,14). La aplicación de HA ocupa el segundo lugar en intervenciones estéticas no quirúrgicas en el año 2016, según la Sociedad Internacional de Cirugía Plástica Estética⁽¹⁵⁾.

Las complicaciones existentes por la aplicación de HA como relleno facial son diversas: eritema, prurito, edema, e infección en el sitio de aplicación, efecto Tyndall, migración del relleno, irregularidades de la superficie, y oclusión vascular^(11,16-19).

La oclusión vascular es una de las complicaciones más serias que puede resultar en ceguera, accidente vascular cerebral, o necrosis cutánea. Ésta resulta en cicatrices permanentes antiestéticas^(18,20,21). Las arterias con mayor

incidencia de oclusión vascular son supratroclear, facial, angular, dorsal de la nariz, infraorbital, y la rama bucal de la maxilar^(22,23). Las áreas correspondientes a la región de la glabella y el dorso de la nariz suelen ser las más afectadas^(16,20,23).

Diversos tratamientos han sido descritos en esta complicación: ácido acetilsalicílico, nitroglicerina tópica y heparina, masaje vigoroso o compresas térmicas, y la Hialuronidasa (HYAL)^(17,24–26).

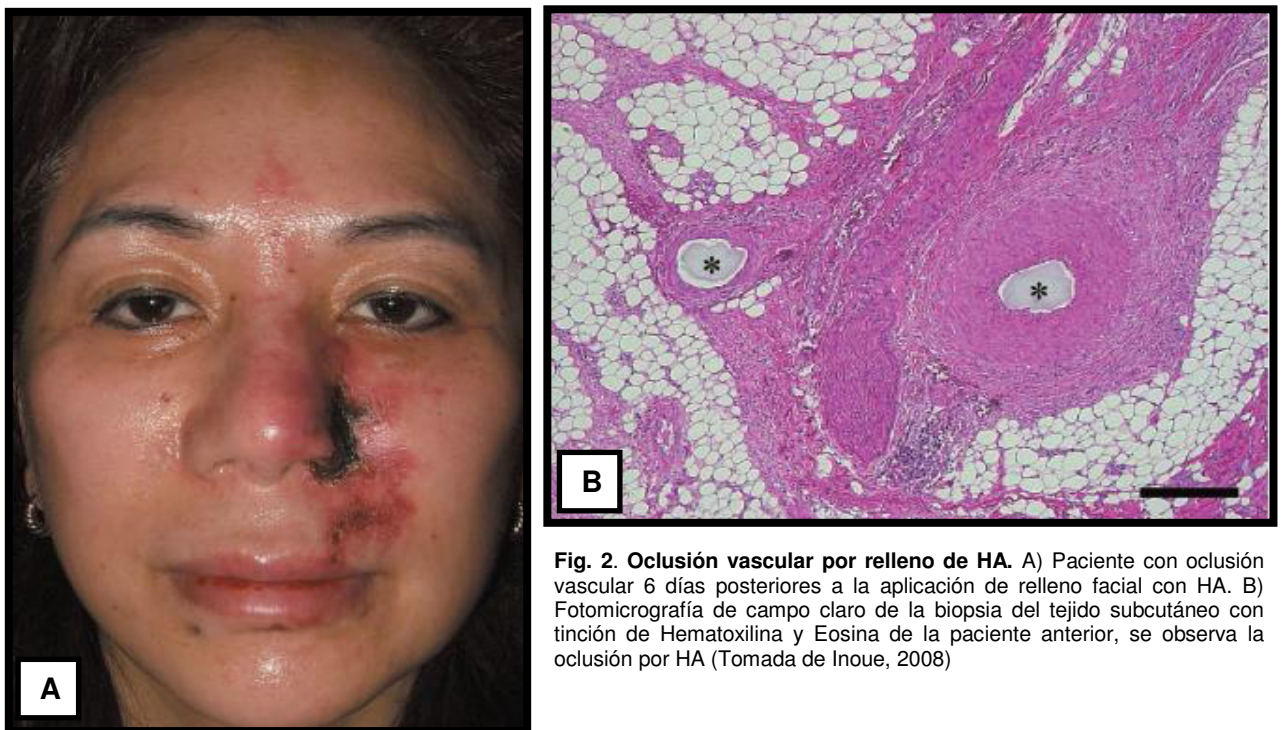


Fig. 2. Oclusión vascular por relleno de HA. A) Paciente con oclusión vascular 6 días posteriores a la aplicación de relleno facial con HA. B) Fotomicrografía de campo claro de la biopsia del tejido subcutáneo con tinción de Hematoxilina y Eosina de la paciente anterior, se observa la oclusión por HA (Tomada de Inoue, 2008)

La HYAL es una enzima que hidroliza el HA y, por lo tanto, regula la permeabilidad de la matriz extracelular^(9,27). La FDA ha aprobado algunas formulaciones comerciales de HYAL de origen humano recombinante para procedimientos como hipodermoclisis, aumento de absorción y dispersión de algunos fármacos, y en urografía SC^(9,28).

Se ha descrito el uso de distintas concentraciones de HYAL comercial aplicadas de forma intraarterial (IA) o SC con fines estéticos^(21,26,29,30), específicamente

como tratamiento emergente para oclusión vascular. Sin embargo, a la fecha no existe suficiente evidencia que establezca una concentración específica que resuelva la oclusión vascular, y que además prevenga la necrosis cutánea. De igual manera, tampoco se han estudiado los posibles cambios morfológicos en los tejidos circundantes posterior a la aplicación SC de distintas concentraciones de HYAL.

1.1.2 ANTECEDENTES

DeLorenzi (2014) realizó un estudio experimental en arterias y venas cadavéricas, en el cual concluyó que el HA es susceptible a hidrólisis con 300UI de HYAL, y que la degradación IA no es necesaria para restaurar la circulación en el tejido isquémico por HA a las 4h, sin observar diferencia visible a las 24h⁽²⁶⁾.

En otro estudio, Vartanian et al., (2005) evaluaron el efecto de la HYAL inyectada en áreas cutáneas posterior al aumento con HA (Restylane®). Se observó que la HYAL reduce dramáticamente el aumento creado por el HA, encontrando una diferencia significativa entre el grupo de inyección con Solución Salina 0.09% comparado con el grupo de HYAL ($p \leq 0.001$). Identificaron también un efecto dosis respuesta relacionada a la HYAL inyectada, sin embargo, no se demostró diferencia estadística significativa. En este estudio se concluye que la inyección intradérmica de HYAL puede ser utilizada para reducir el aumento dérmico de HA previamente inyectado⁽³¹⁾.

Años más tarde, Zhuang et al., (2016) establecieron un modelo de embolismo por HA en oreja de conejo. Se evaluó macroscópicamente por angiografía de fluorescencia además de histopatológicamente. En el análisis histológico se observó que el tercio distal de la arteria central auricular se encontraba parcialmente obstruido por HA con un volumen inyectado de 10 μ L de HA. Además observaron infiltrado de células inflamatorias en las túnica media y adventicia. Con 20 μ L observaron mayor cantidad de HA en la luz arterial y una disminución en el grosor de la túnica media así como degeneración vacuolar en la misma. En el grupo con volumen de 40 μ L no observaron HA, sin embargo, se describe hiperplasia del endotelio así como estenosis de la luz arterial. En este estudio se determinó que la severidad del embolismo es proporcional al volumen de HA inyectado⁽³²⁾.

De manera interesante, Kim et al., (2011) describen la eficiencia de 750 UI de HYAL, aplicada de forma SC a las 4 y 24h, posteriores a la inducción de embolismo con 0.25 ml de HA en arteria auricular posterior de conejos. En este estudio, se describe que la administración temprana de HYAL aplicada de forma SC disminuye las complicaciones dermatológicas⁽²¹⁾.

Por otra parte, Chiang et al., (2016) investigaron el uso de la HYAL IA combinada con uroquinasa en dos colgajos irrigados por las arterias epigástricas inferiores en 40 ratas macho. Se inyectaron vía IV 0.02 ml de HA y se evaluó durante 45 min el uso de 2500UI/kg de HYAL o 50000UI/kg de uroquinasa por separado, así como la combinación de ambas enzimas; se analizó también el efecto de Solución Salina 0.09% como control vehículo. En este estudio se reporta que el uso combinado de HYAL con uroquinasa puede incrementar la supervivencia del colgajo y mejora la tasa de reperfusión en oclusión arterial por HA⁽³⁰⁾.

También, Wang et al., (2017) evaluaron la degradación de HA con HYAL, y compararon los tratamientos IA y SC de forma in vitro e in vivo. Encontraron que el flujo sanguíneo de la microcirculación se reestableció en los grupos de aplicación de HYAL SC e IA ; sin embargo, los autores describen un mejor efecto con la aplicación SC, y determinaron que los mejores resultados en este grupo son debido a una difusión de la HYAL a mayor escala; esto permite el movimiento de HYAL hacia los vasos ocluidos y degrada el HA⁽³³⁾.

Además, DeLorenzi (2017), describe un nuevo protocolo de aplicación de HYAL, en donde establece el uso de una dosis alta pulsada dependiendo del área afectada. Se propone iniciar con 500UI o 1,000UI seguido de 500UI hasta lograr la resolución de la isquemia. Se evalúa clínicamente el llenado capilar, coloración de la piel y ausencia de dolor; y en caso necesario se repite la dosis⁽²⁹⁾.

Recientemente, Wattanakrai et al., (2018) evaluaron el efecto de 1500UI de HYAL en arterias cadavéricas ligadas de los extremos, sin la presencia de embolismo. En el análisis histológico observaron degeneración del endotelio y separación de las tunicas íntima y media a las 4h⁽³⁴⁾.

1.2 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la aplicación de HA se posiciona en el segundo lugar de los primeros 5 procedimientos estéticos no invasivos. La necrosis por embolismo de alguna arteria localizada en las áreas de aplicación de este tipo de relleno es una de las más impactantes, ya que puede ocasionar lesiones como cicatrices permanentes y ceguera.

A la fecha no existe un tratamiento estandarizado para la atención de este tipo de complicación, ni se han estudiado los cambios morfológicos posteriores a la aplicación de HYAL. Se han reportado distintos esquemas; sin embargo, las dosis reportadas en la literatura no han sido comparadas entre sí para establecer una dosis óptima y segura.

1.3 HIPÓTESIS

La aplicación extravascular de HYAL es efectiva y segura para la degradación de un émbolo de HA.

1.4 OBJETIVO GENERAL

Determinar una concentración efectiva y segura de HYAL aplicada extravascularmente para disolver un émbolo de HA.

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un modelo lagomorfo de embolismo por HA.
2. Evaluar el efecto de tres concentraciones de HYAL sobre un émbolo de HA.
3. Analizar la morfología posterior a la aplicación extravascular de HYAL.

CAPÍTULO 2

2.1 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.1 TIPO DE ESTUDIO, DISEÑO Y LUGAR DE REFERENCIA

Se realizó un ensayo experimental en un modelo animal, prospectivo, comparativo y longitudinal. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microcirugía del Departamento de Anatomía Humana y en el Laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. El manejo de los animales de laboratorio fue coordinado por el Dr. Alejandro Quiroga Garza, el MVZ Gilberto Arévalo Martínez y la MCP Yolanda Salinas Álvarez además, se contó con la supervisión del Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña.

2.1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

En la muestra se incluyeron 15 conejos machos y hembras de la raza Nueva Zelanda, adultos, 6 meses de edad al inicio del protocolo y con peso entre 3 kg y 4 kg, esqueléticamente maduros, y clínicamente sanos. Se excluyeron aquellos que presentaran lesiones cutáneas, inmovilidad de las extremidades, con peso menor a 3 kg o que no se encontraran sanos. Se eliminaron del estudio los conejos que murieron durante el procedimiento quirúrgico o en el periodo postquirúrgico. El número de muestra se decidió por conveniencia en base a estudios previos^(21,30,33) y de acuerdo con las Guías Internacionales del Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio.

2.1.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales se dividieron en 5 grupos experimentales de distribución aleatoria (n=3) y en función de la dosis de HYAL.

Tabla 1. Distribución de grupos experimentales y sus características metodológicas.

GRUPO EXPERIMENTAL	CARACTERÍSTICAS
Grupo Control Quirúrgico (n= 3)	<ul style="list-style-type: none"> • Con abordaje quirúrgico • Sin embolismo de HA • Sin HYAL SC • Sin 3.5 ml de NaCl 0.9% SC
Grupo Control Embolismo (n= 3)	<ul style="list-style-type: none"> • Con abordaje quirúrgico • Con embolismo de HA • Sin HYAL SC • Con 3.5 ml de NaCl 0.9% SC
Grupo Control Sano: 3 muestras de extremidades inferiores izquierdas del Grupo Control Quirúrgico	<ul style="list-style-type: none"> • Sin abordaje quirúrgico • Sin embolismo de HA • Sin HYAL SC • Con NaCl 0.9% SC
Grupo Dosis Baja (n= 3)	<ul style="list-style-type: none"> • Con abordaje quirúrgico • Con embolismo de HA • Dosis 75UI de HYAL (0.25 ml) disuelta en 3.25 ml de NaCl 0.9% SC
Grupo Dosis Media (n= 3)	<ul style="list-style-type: none"> • Con abordaje quirúrgico • Con embolismo de HA • Dosis 200UI de HYAL (0.66 ml) disuelta en 2.84 ml de NaCl 0.9% SC
Grupo Dosis Alta (n= 3)	<ul style="list-style-type: none"> • Con abordaje quirúrgico • Con embolismo de HA • Dosis 500UI de HYAL (1.66 ml) disuelta en 1.84 ml de NaCl 0.9% SC

2.1.4 CUIDADO Y MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los conejos se atendieron de acuerdo con las regulaciones internacionales vigentes y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio³³⁾. Los animales permanecieron en jaulas en el Laboratorio de Microcirugía del Departamento de Anatomía Humana, con un ciclo constante de luz y oscuridad de 12h, sistema de ventilación adecuada, temperatura y humedad constantes en 22°C y 60% respectivamente; se realizó limpieza de las jaulas 3 veces por semana. Los conejos fueron alimentados con alimento especial para conejos de laboratorio e hidratados *ad libitum* con agua.

2.1.5 ANESTESIA, ANALGESIA Y ANTIBIOTICOTERAPIA DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La sujeción de los conejos se realizó tomando de forma suave y firme la piel de la nuca y dorso con la mano dominante, y con la otra mano se sujetaron los muslos.

Se indujo anestesia profunda con Ketamina 25-50mg/kg y Xilacina 3.5-10mg/kg IM. Posterior a 15 minutos de su aplicación se confirmó el plano anestésico mediante reflejo corneal y ausencia de movimiento. En seguida, se rasuraron las regiones: abdominal inferior, inguinal, y ambas extremidades inferiores anterior y posterior, mediante una técnica limpia.

2.1.6 ABORDAJE QUIRÚRGICO

Posterior a la anestesia y rasurado de los conejos de los grupos Control (excepto Control Sano) y con tratamiento, se colocaron en la mesa quirúrgica sujetando sus extremidades con gasas y se realizó asepsia de la región abdominal, inguinal, y extremidades anteriores con Yoduro de Yodopovidona (Isodine®). Se reguló la temperatura del animal con bolsas líquidas calientes.

Se colocaron campos estériles dejando visible solamente el área quirúrgica y se realizó una incisión de 1.5cm inferior al canal inguinal disecando por planos hasta localizar el paquete neurovascular femoral de la extremidad inferior izquierda; se disecó y se traccionó la arteria femoral izquierda. Se introdujo el catéter 24G para inyectar 0.5 ml de Solución Salina 0.9% en el grupo Control Quirúrgico (Fig. 2A y B). Se retiró el catéter, se verificó que existiera hemostasia y se suturó la piel con Nylon 3-0.

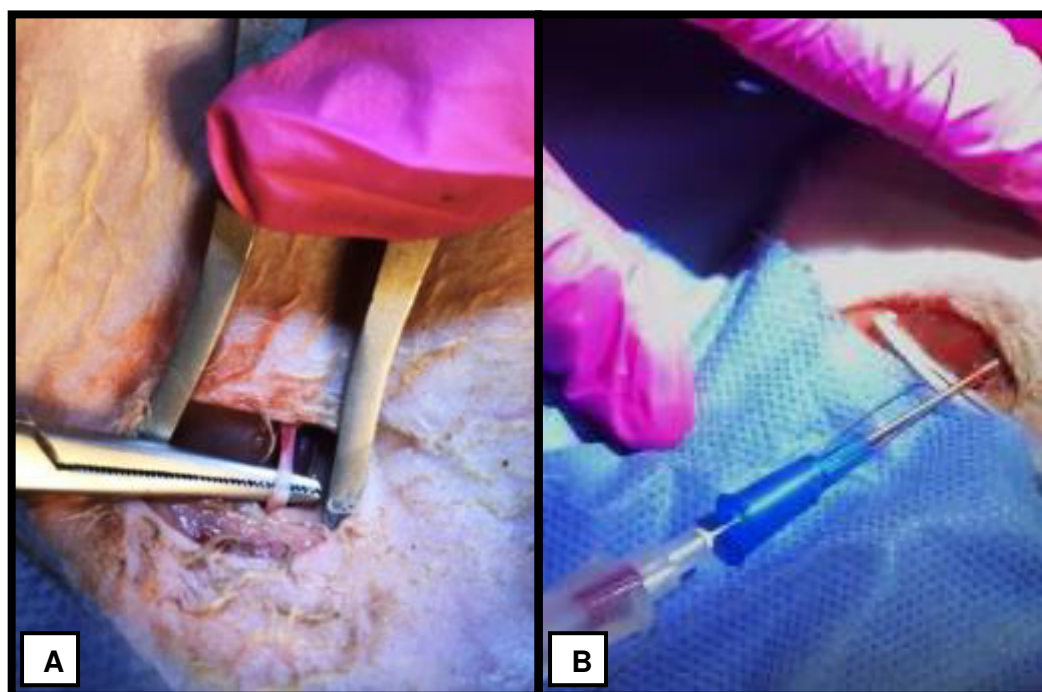


Fig. 3. Abordaje quirúrgico. A) Disección de la arteria femoral izquierda. B) Introducción de catéter en arteria femoral izquierda.

2.1.7 EMBOLISMO POR HA

Se realizó el mismo abordaje previamente descrito, una vez introducido el catéter 24G se inyectó 0.5 ml de HA (Belotero Balance®) para crear un émbolo en la arteria femoral. La creación del émbolo se comprobó mediante la observación directa.

Una vez realizado el abordaje quirúrgico y embolismo, se secó el pelaje que pudiera quedar húmedo, se proporcionó agua y comida, y se administró

Ketoprofeno 2mg/kg SC cada 24h por 5 días. Se posicionaron en decúbito lateral en sus jaulas. Además, se administró en el agua Tramadol 0.5mg/ml para su consumo regular, se utilizó como antibioticoterapia Ampicilina 10-20mg/kg cada 12h y se comprobó el consumo de agua y comida en el periodo postoperatorio.

2.1.8 ADMINISTRACIÓN EXPERIMENTAL DE HYAL

Se utilizó HYAL recombinante de la marca X. Prof 150 Reductonidasa de Mesoestetic® (1500UI) reconstituida en 5 ml de Solución Salina al 0.9%. Se inyectó a tres grupos experimentales con abordaje quirúrgico previo y embolizados con HA; se aplicó en 3 distintas concentraciones de acuerdo con el grupo experimental correspondiente utilizando una jeringa de 5 ml y una aguja 27G de forma SC en la extremidad inferior derecha distribuyendo el volumen total de la solución en el trayecto de las arterias femoral y safena (Fig.3).

Tabla 2. Dosis de HYAL SC.

DOSIS BAJA EMBOLISMO/	DOSIS MEDIA EMBOLISMO/	DOSIS ALTA EMBOLISMO/
75 UI HYAL (0.25mL)	200UI HYAL (0.66mL)	500UI HYAL (1.66mL)
3.25mL NaCL 0.9%	2.84mL NaCL 0.9%	1.84mL NaCL 0.9%

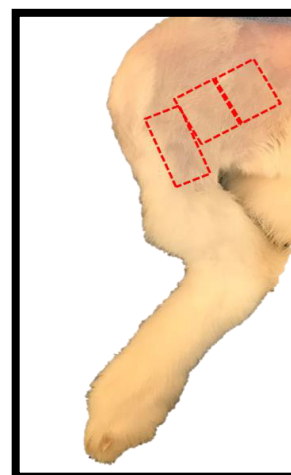


Fig. 3. Sitios de aplicación SC de HYAL.

Las concentraciones de HYAL fueron: 75UI (0.25 ml), 200UI (0.66 ml) y 500UI (1.66 ml) correspondientes a los grupos de Dosis Baja, Media y Alta (Tabla 2). Se agregó en la misma jeringa 3.35 ml, 2.84 ml y 1.84 ml de Solución Salina al 0.9% para completar 3.5 ml de solución respectivamente que se aplicaron de forma SC.

2.1.9 DOCUMENTACIÓN CLÍNICA Y REGISTRO FOTOGRÁFICO

Posterior al abordaje quirúrgico y tratamiento se tomaron fotografías de ambas extremidades inferiores de forma anterior a las 24h y a los días 2, 3 y 4.

También en estos días se recolectaron y documentaron datos clínicos de hipoperfusión, cambio en coloración de la piel, ulceración, necrosis entre otros datos.

2.1.10 CRITERIOS DE PUNTO FINAL

Se realizó vigilancia diaria del dolor evaluando la presencia de los siguientes signos: piloerección, anorexia, deshidratación, comportamiento agresivo, aislamiento o automutilación, ojos hundidos o casi cerrados, respuesta a estímulos, taquipnea y estornudos. En caso de que tuviera 5 de estos 9 signos en la evaluación de dolor, considerado severo, se realizaría eutanasia del animal de experimentación mediante dosis letal de pentobarbital sódico.

2.1.11 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Los animales de los grupos Control y de embolismo tratados con HYAL fueron eutanizados al día 4 posterior al abordaje quirúrgico, se realizó con Pentobarbital Sódico en dosis letal (100-150 mg/kg IV) en la vena marginal del conejo. La confirmación de la muerte se realizó mediante la observación de 5 minutos de la ausencia de respiración, movimiento y pulso. En seguida se obtuvieron muestras de aproximadamente 1x1cm de piel de la región femoral, además de muestras de aproximadamente 3-4cm de la región proximal del paquete neurovascular femoral de la extremidad inferior izquierda, incluyendo los músculos. Se tomaron las mismas muestras en la extremidad inferior derecha del grupo Control Sano. Los cadáveres fueron dispuestos en bolsas amarillas para su destino final de acuerdo con lo establecido en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

2.1.12 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Las muestras se fijaron durante 24h en solución de formalina al 10% en PBS 1X pH 7.2-7.4. A las 24h se cortaron y colocaron en casetes de inclusión y se sumergieron de nuevo en formalina al 10% durante 24h más.

Posteriormente se procesaron por la técnica histológica convencional hasta su inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos de 5 μ m y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina para evaluar la histología general, con el método Tricrómico de Masson para visualizar músculo y tejido conectivo; Orceína para identificar fibras elásticas y por el método histoquímico de Azul Alcian pH 1, para la identificación de mucopolisacáridos ácidos como el HA (ver Apéndice A).

2.1.13 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE HA

Se seleccionó una laminilla de cada conejo en la que existió la presencia de HA en la luz de la arteria femoral de los grupos Control Embolismo y tratados, así como de los grupos Control Sano y Control Quirúrgico. Se tomaron fotomicrografías con el objetivo de 4X y se cuantificó por microdensitometría la coloración azul correspondiente a HA con el programa Image J V. 1.51. (NIH).

2.1.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó estadística descriptiva de los datos obtenidos de la cuantificación de HA, se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para establecer la normalidad de la muestra; una vez establecida la normalidad ($p \leq 0.05$) se realizó análisis de varianza de 1 factor (ANOVA), y debido a que la significancia estadística resultante fue $p \leq 0.001$, se realizó una prueba Posthoc con corrección de Bonferroni.

CAPÍTULO 3

3.1 RESULTADOS

3.1.1 EL RELLENO FACIAL DE HA PERMANECE DESPUÉS DE LA TÉCNICA HISTOLÓGICA CONVENCIONAL.

Con la finalidad de determinar si el HA entrecruzado permanecía después de la técnica histológica convencional se realizó el procesamiento histológico de un segmento de arteria tibial de un cadáver a la que se le inyectó HA Belotero Balance®. Se realizó la tinción de Hematoxilina y Eosina, y el método histoquímico de Azul Alcían (Fig.4). Se observó bajo microscopía de campo claro.

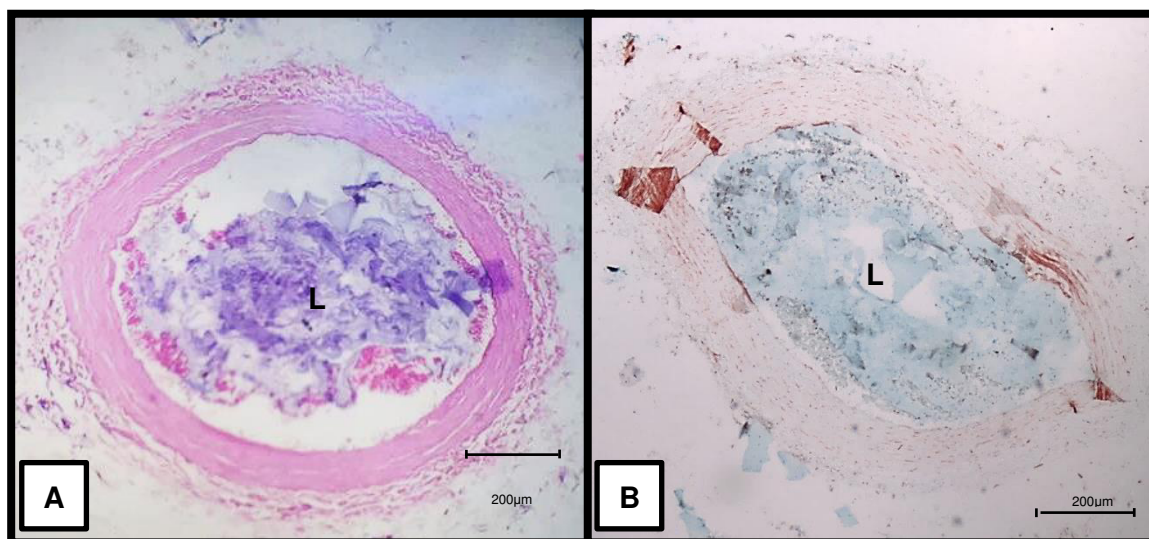


Fig. 4. La técnica histológica convencional no elimina el HA entrecruzado. A) Corte transversal de arteria tibial de cadáver. Se observa el HA de color morado en la luz arterial. B) Corte transversal de arteria tibial de cadáver. Se observa el HA de color azul en la luz arterial. Tinción A: Hematoxilina y Eosina. B: Histoquímica Azul Alcían con Rojo Neutro. Luz arterial (L). Barra 200µm.

Con la tinción de Hematoxilina y Eosina se observó un material basófilo en la luz arterial. Se comprobó posteriormente con la histoquímica de Azul Alcían, que el HA permanecía aún después de la técnica histológica convencional, y

que por lo tanto era posible procesar las muestras mediante esta técnica.

3.1.2 EL MODELO LAGOMORFO DE EMBOLISMO FEMORAL POR HA POSEE MAYOR SIMILITUD CON EL SITIO DE APLICACIÓN CLÍNICA.

En este estudio se estableció un nuevo modelo de embolismo lagomorfo, ya que se consideró que los modelos de embolismo actuales en oreja de conejo no cuentan con las características morfológicas similares al sitio de aplicación del relleno facial, ya que la oreja posee una piel muy delgada, tiene la presencia de cartílago hialino, escaso músculo y además no cuenta con tejido adiposo (Fig.5).

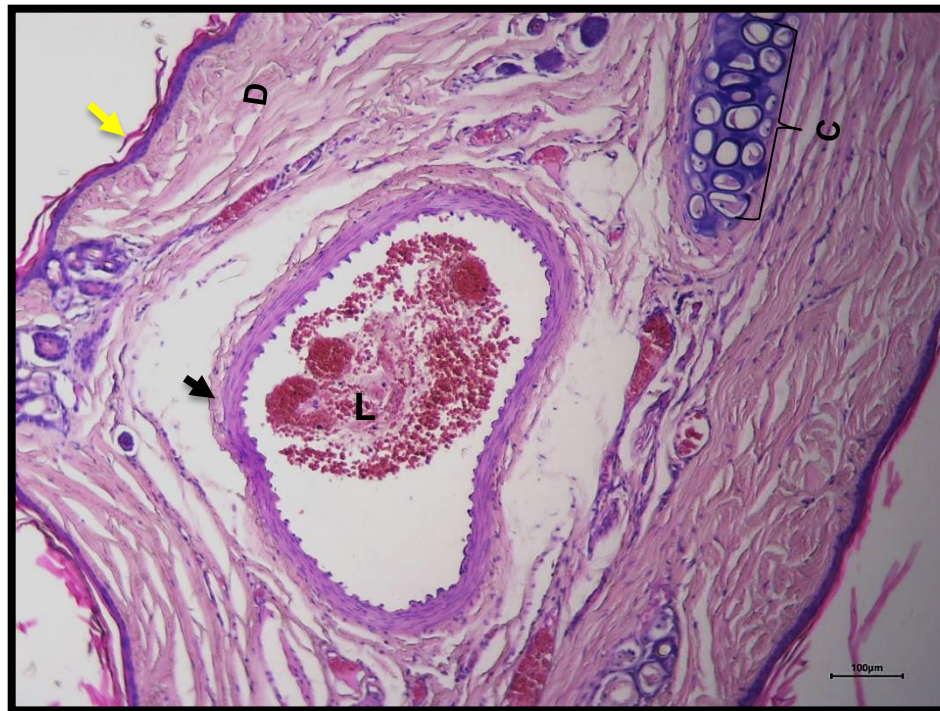
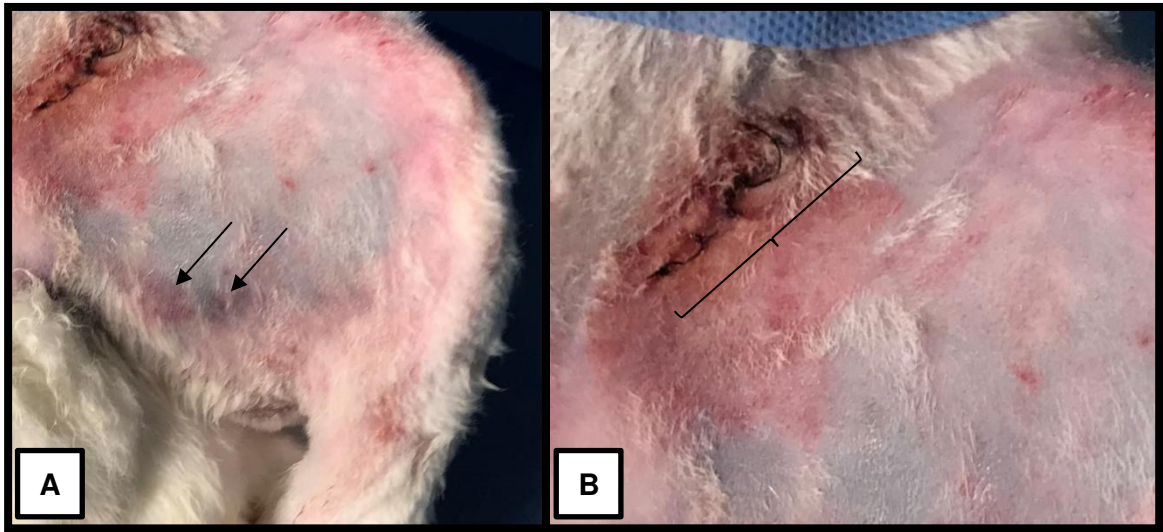


Fig. 5. El modelo de embolismo por HA en oreja de conejo no tiene similitud con el sitio de aplicación clínica. Arteria central auricular (flecha negra). Epidermis (flecha amarilla), dermis (D), cartílago hialino (C). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Barra 100µm.

3.1.3 ESTABLECIMIENTO DE UN NUEVO MODELO LAGOMORFO DE EMBOLISMO POR HA.

El nuevo modelo de embolismo por HA posee mayor similitud con el sitio de aplicación clínica del relleno facial de HA. Macroscópicamente se observó cambio de coloración en la piel, y una mala cicatrización de la herida quirúrgica



(Fig. 6).

Fig. 6. El modelo de embolismo femoral por HA presenta cambios macroscópicos. A) Modelo lagomorfo de embolismo femoral por HA 4 días posteriores al abordaje quirúrgico. Se observa cambio en la coloración de la piel y hematomas. B) Herida quirúrgica del modelo de embolismo, se observa mala cicatrización. Hematomas (flechas negras), herida quirúrgica (llave).

3.1.4 COMPARACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS GRUPOS CONTROL.

Al comparar los tres grupos se observó que los grupos Control Sano y Quirúrgico no presentaron eritema, hematomas, ni atrofia muscular. Además en el grupo Control Quirúrgico se observó una herida quirúrgica con adecuada cicatrización. En comparación con el grupo Control de Embolismo, se observa la herida quirúrgica con inadecuada cicatrización, eritema, hematomas, equimosis y atrofia muscular (Fig. 7).

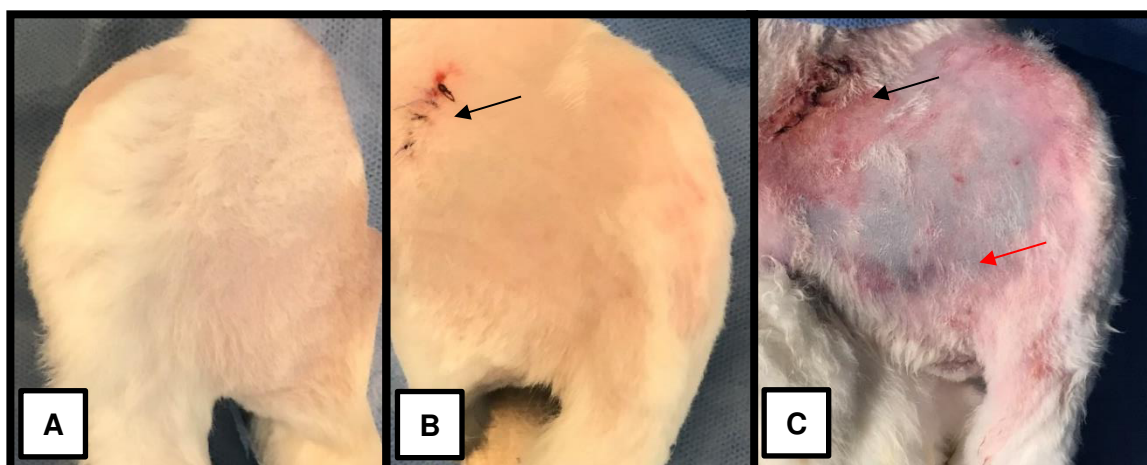


Fig. 7. El grupo Control de Embolismo presenta mayores cambios en comparación con los grupos Control Sano y Quirúrgico. A) Control Sano. Se observa de aspecto y coloración normal. B) Control quirúrgico. Se observa de color y aspecto normal, adecuada cicatrización de la herida quirúrgica. C) Control de Embolismo. Se observa eritema, equimosis y hematomas, y mala cicatrización de la herida quirúrgica. Herida quirúrgica (flecha negra), hematomas (flecha roja).

En el análisis semicuantitativo, se realizó la evaluación del dolor y movilidad de la extremidad inferior: el grupo Control de Embolismo presentó mayor dolor previo a la eutanasia y menor movilidad de la extremidad en comparación con los grupos Control Sano y Quirúrgico (Tabla 3).

Tabla 3. Tabla semicuantitativa de hallazgos clínicos al 4° día posterior al abordaje quirúrgico.

HALLAZGOS	CONTROL SANO n=3	CONTROL QUIRÚRGICO n=3	EMBOLISMO (HA) n=3
Cambio de coloración	-	-	+++
Disminución del volumen muscular	-	-	+++
Dolor previo a eutanasia	-	-	+++
Movilidad de extremidad	+++	+++	++

/ - Ausente / + Leve / ++ Moderado / +++ Severo /

3.1.5 CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL MODELO DE EMBOLISMO FEMORAL LAGOMORFO Y SU COMPARACIÓN CON LOS GRUPOS CONTROL SANO Y QUIRÚRGICO.

En el modelo de embolismo establecido se evaluaron los cambios morfológicos en la arteria. Al observar el grupo Control Sano y Control Quirúrgico, observamos una luz arterial limpia (Fig. 8A y B). Sin embargo, en el grupo de Control Embolismo, se observaron dos fenómenos: el primero mostró regiones de la arteria femoral en la que su luz se encontraba obstruida en su totalidad por abundantes eritrocitos, fibrina, plaquetas y escaso HA (Trombosis) (Fig. 8C). En el segundo, se observó la arteria femoral casi obstruida en su totalidad por HA, además de eritrocitos (Fig. 8D). La presencia de HA se confirmó con el método histoquímico Azul Alcían, observando una positividad de color azul en la luz arterial en el grupo Control de Embolismo (Fig. 12D).

Además se caracterizaron los cambios morfológicos en la arteria femoral posterior al embolismo. En el grupo Control Sano y Control Quirúrgico se observa la pared arterial, en dónde es posible distinguir adecuadamente las tunicas íntima, media y adventicia, con un grosor similar y morfología normal. La lámina elástica interna se observa fenestrada y así como el endotelio se encuentra preservado en ambos grupos (Fig. 9A y B).

A diferencia de lo anterior, en el grupo Control de Embolismo, se observaron cambios en la pared arterial. En los sitios donde localizamos trombosis, el endotelio en la túnica íntima se encuentra desprendido, y la lámina elástica interna se observa rota. La túnica media también se encuentra rota con abundante infiltrado de eritrocitos y células inflamatorias como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos (Fig. 9C). En cambio, en los sitios de embolismo con abundante HA la pared arterial se observa más delgada. En la túnica íntima, el endotelio se observa desprendido, la lámina elástica interna pierde su morfología normal y no se aprecia fenestrada. Las tunicas media y adventicia disminuyen su grosor (Fig. 9D). Estos datos fueron corroborados con los métodos de Tricrómico de Masson (Fig. 10) y Orceína (Fig. 11).

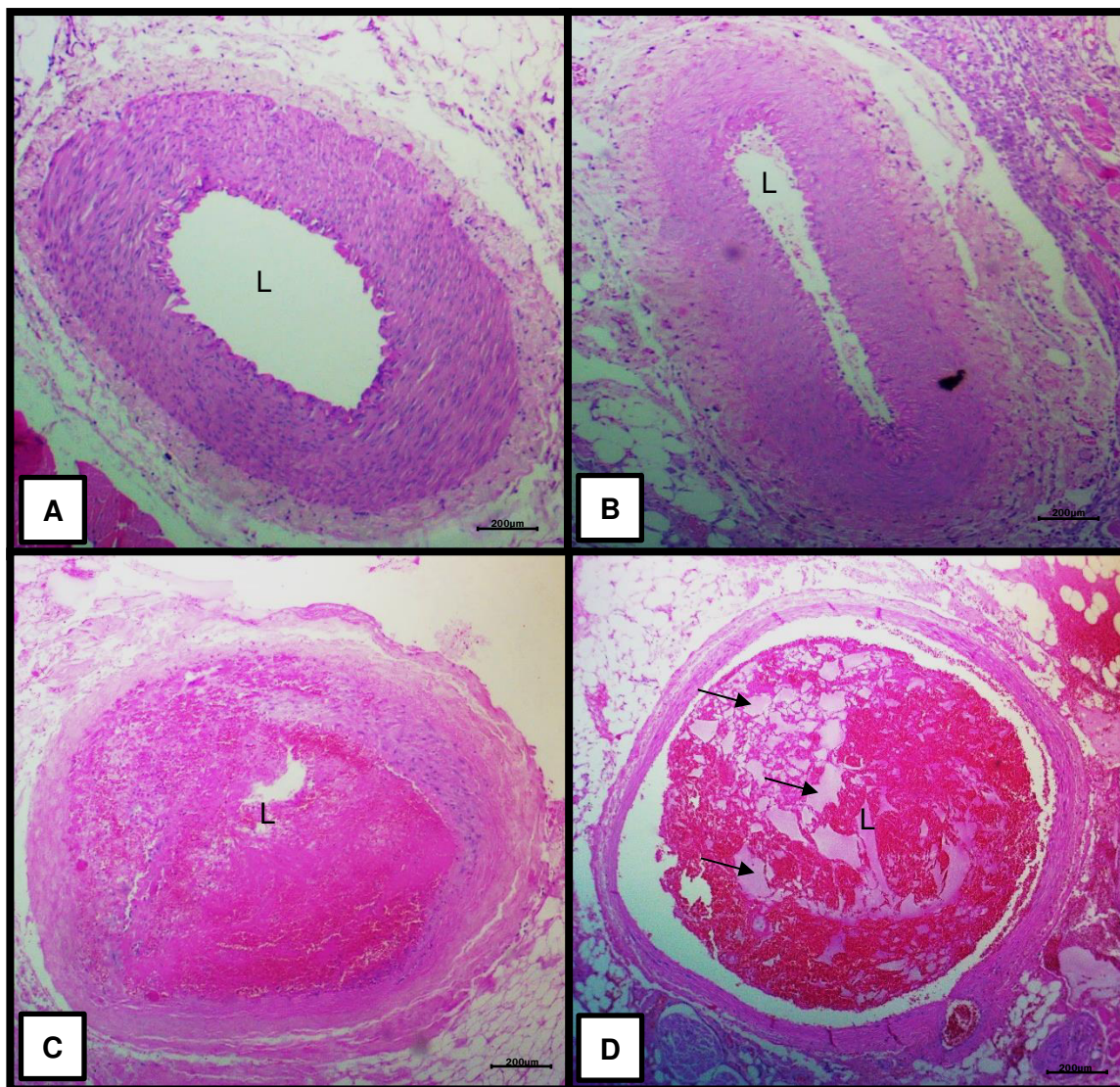


Fig. 8. El embolismo por HA causa obstrucción de la luz arterial. A) Arteria femoral grupo Control Sano. Se observa la luz arterial limpia. B) Arteria femoral grupo Control Quirúrgico. Se observa la luz arterial limpia. C) Arteria femoral grupo Control de Embolismo. Se observa trombosis arterial con ausencia de HA en la luz. La luz arterial se observa ocluida en su totalidad. D) Arteria femoral grupo Control Embolismo. Se observa la luz arterial ocluida por abundante HA y eritrocitos. Luz arterial (L), HA (flechas negras). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Barra 200µm.

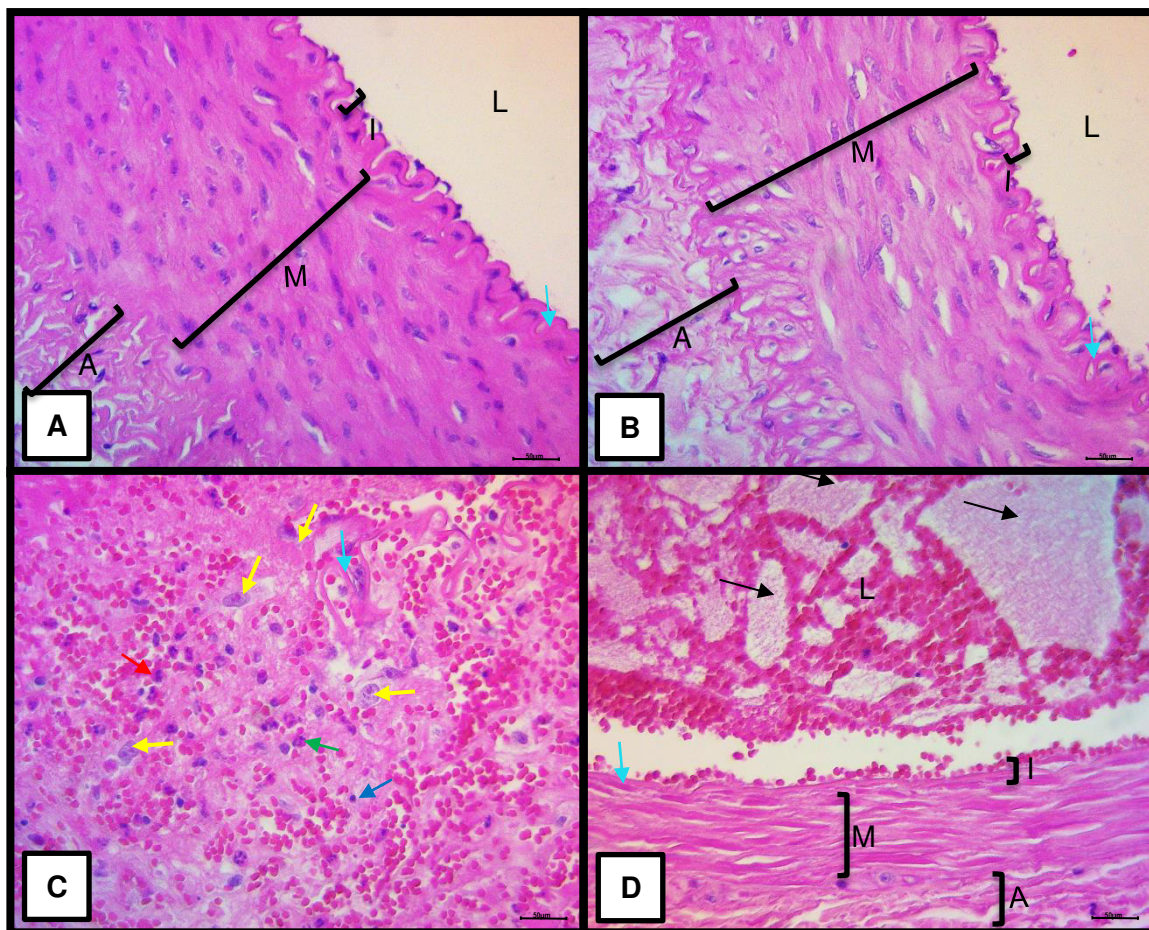


Fig. 9. El embolismo por HA causa cambios estructurales en la pared arterial. A) Pared arterial del grupo Control Sano. Se observan las tunicas íntima, media y la adventicia íntegras, la lámina elástica interna y el endotelio se observan de morfología normal. B) Pared arterial del grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el grupo Control Sano. C) Pared arterial del grupo Control de Embolismo con trombosis. No se distinguen las tunicas arteriales, la lámina elástica interna se observa rota, y el endotelio desprendido. Se observa abundante infiltrado inflamatorio, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos. D) Pared arterial del grupo Control de Embolismo con abundante HA. Se observan las tunicas arteriales preservadas pero disminuidas en grosor. La lámina elástica interna y externa pierden su morfología normal y no se observan fenestradas. Tunicas íntima (I), media (M), adventicia (A). Lámina elástica interna (flecha celeste), luz arterial (L), HA (flechas negras), macrófagos (flecha amarilla), linfocitos (flecha azul), eosinófilos (flecha roja), neutrófilos (flecha verde). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Barra 50µm.

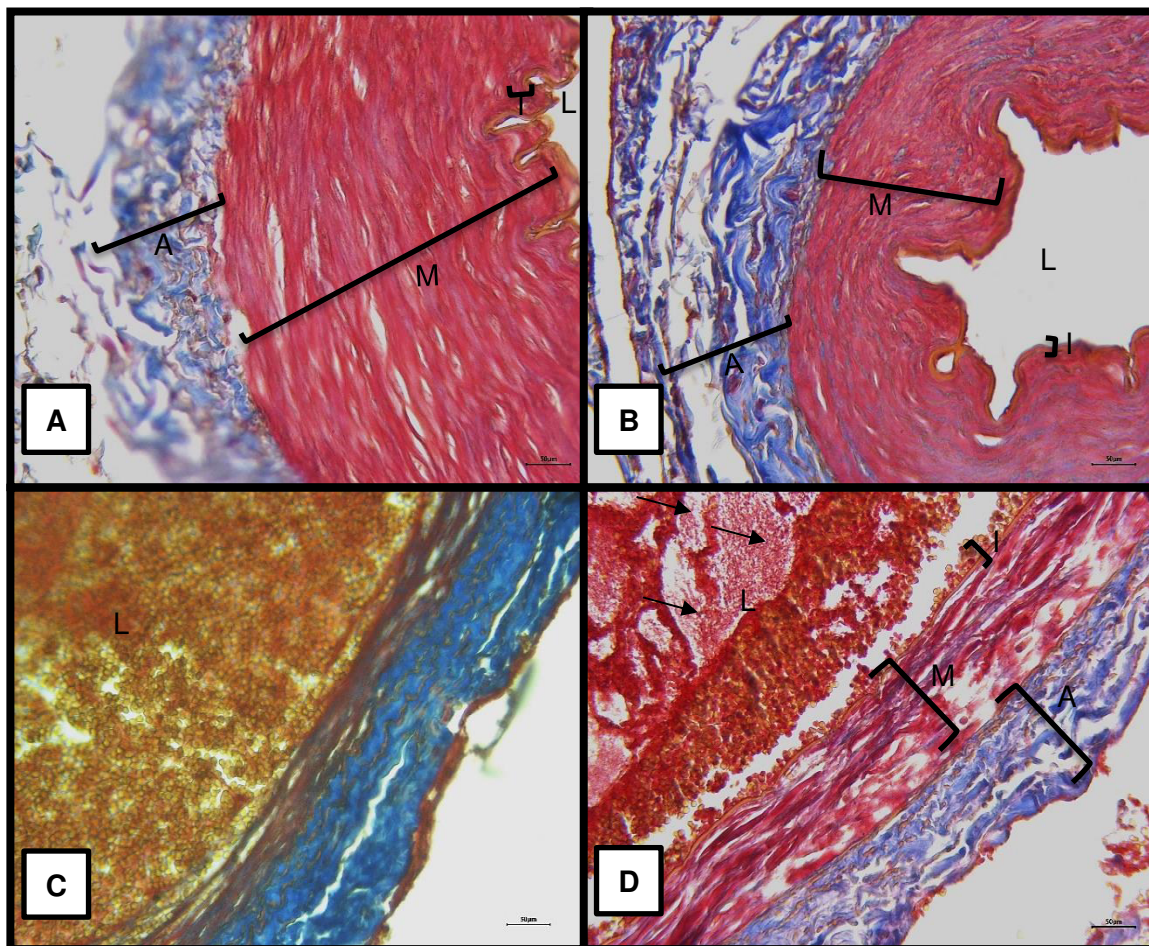


Fig. 10. Confirmación de los cambios estructurales en la pared arterial ocasionados por el embolismo. A) Pared arterial del grupo Control Sano. Se observan las tunicas íntima, media y adventicia de morfología normal. El músculo liso se observa de color rojo y las fibras de colágeno de la túnica adventicia de color azul. B) Pared Arterial del grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el grupo Control Sano. C) Pared arterial del grupo Control de Embolismo con trombosis. Se observan rotas las tunicas íntima y media. El músculo liso se observa de color rojo y las fibras de colágeno de la túnica adventicia de color azul. D) Arteria Femoral del grupo Control de Embolismo con HA. Se observan las tunicas arteriales preservadas pero disminuidas en grosor. El músculo liso se observa de color rojo y las fibras de colágeno de la túnica adventicia de color azul. Luz arterial (L), HA (flechas negras), tunicas íntima (I), media (M), adventicia (A). Tinción: Tricrómico de Masson. Barra 50µm.

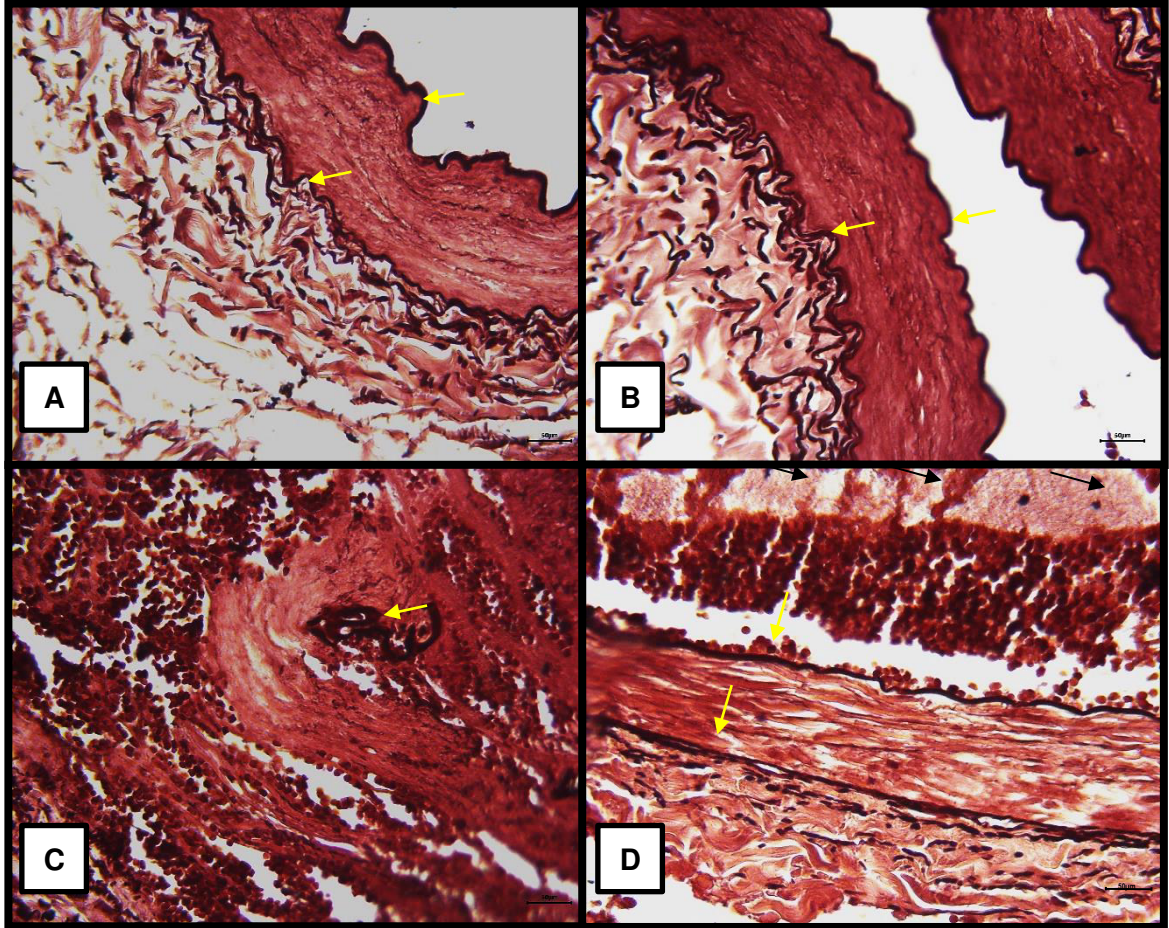


Fig. 11. El embolismo por HA causa cambios morfológicos en las fibras elásticas de la pared arterial. A) Pared arterial del grupo Control Sano. Se observan las láminas elásticas interna y externa fenestradas, de morfología normal. B) Pared Arterial del grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el grupo Control Sano. C) Pared arterial del grupo Control de Embolismo con trombosis. Se observa la lámina elástica interna rota. D) Pared arterial del grupo Control de Embolismo con HA. Se observa las láminas elásticas interna y externa preservadas pero pierden su fenestración normal. Lámina elástica interna y externa (flecha amarilla), HA (flecha negra). Tinción: Orceína. Barra 50µm.

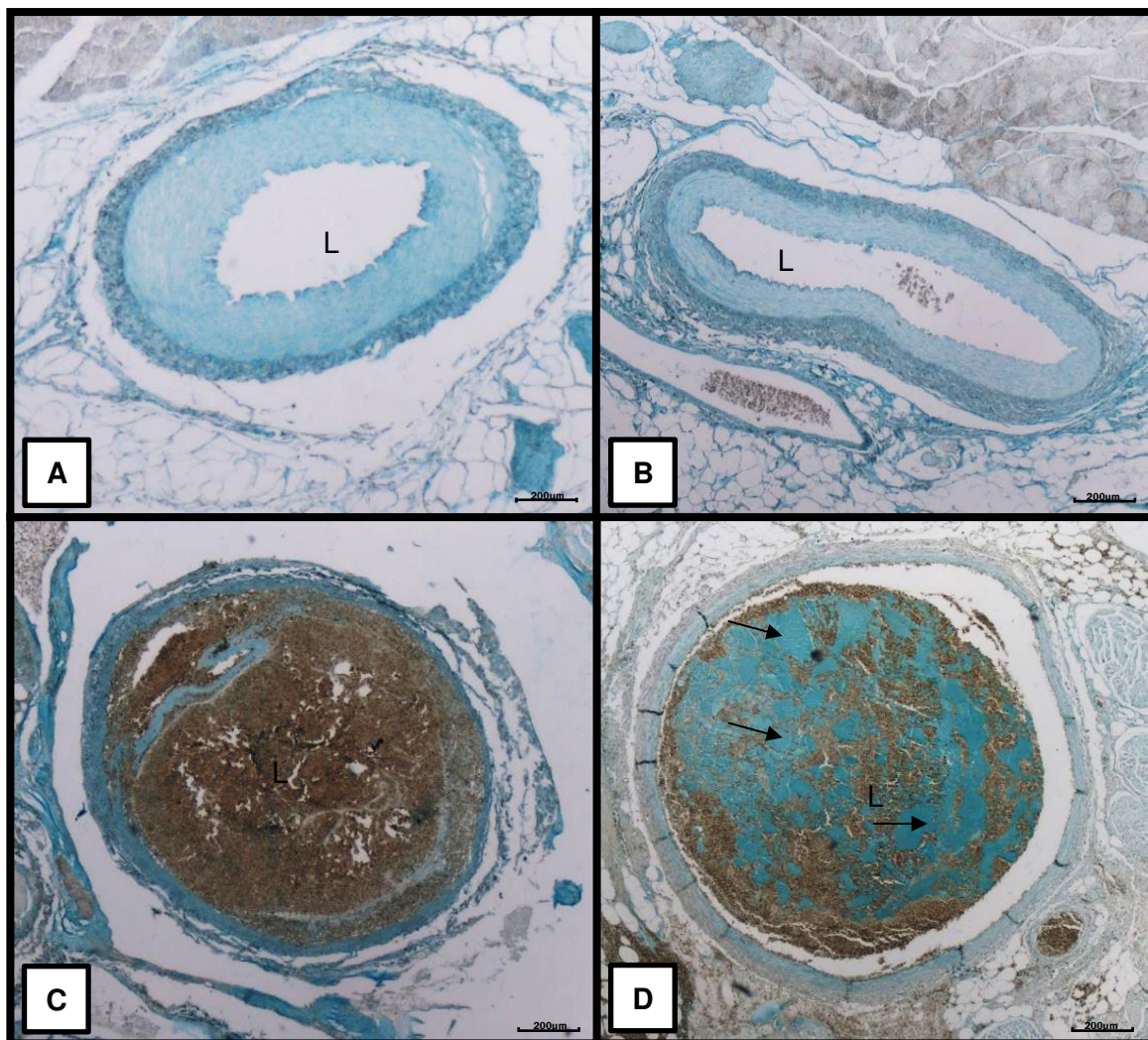


Fig. 12. Identificación de HA en la luz arterial del grupo Control de Embolismo. A) Arteria femoral del grupo Control Sano. Se observa la luz arterial limpia. B) Arteria femoral del grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el grupo Control Sano. C) Arteria femoral del grupo Control de Embolismo con trombosis. Se observa la luz arterial obstruida en su totalidad por eritrocitos, las tunicas íntima y media se observan desprendidas de color celeste en la luz arterial. D) Arteria femoral del grupo Control de Embolismo. Se observa la luz arterial obstruida por abundante HA que se observa de color azul en la luz arterial y eritrocitos. Luz arterial (L), HA (flechas negras). Histoquímica: Azul Alcian. Barra 200µm.

3.1.6 MEJORÍA CLÍNICA PARCIAL EN GRUPO DE EMBOLISMO TRATADO CON DOSIS ALTA DE HYAL.

Al comparar los grupos control previamente descritos contra los grupos tratados con Dosis Baja, Media y Alta de HYAL, se observó una adecuada cicatrización de la herida quirúrgica en todos los grupos tratados. En el grupo Control de Embolismo tratado con 75UI HYAL, se observó equimosis y hematomas en la extremidad. El grupo tratado con 200UI presentó una disminución de los mismos datos. Cabe destacar que el grupo tratado con 500UI no presentó cambio en la coloración de la piel, equimosis ni hematomas; similar al grupo Control Sano y Control Quirúrgico (Fig. 13).

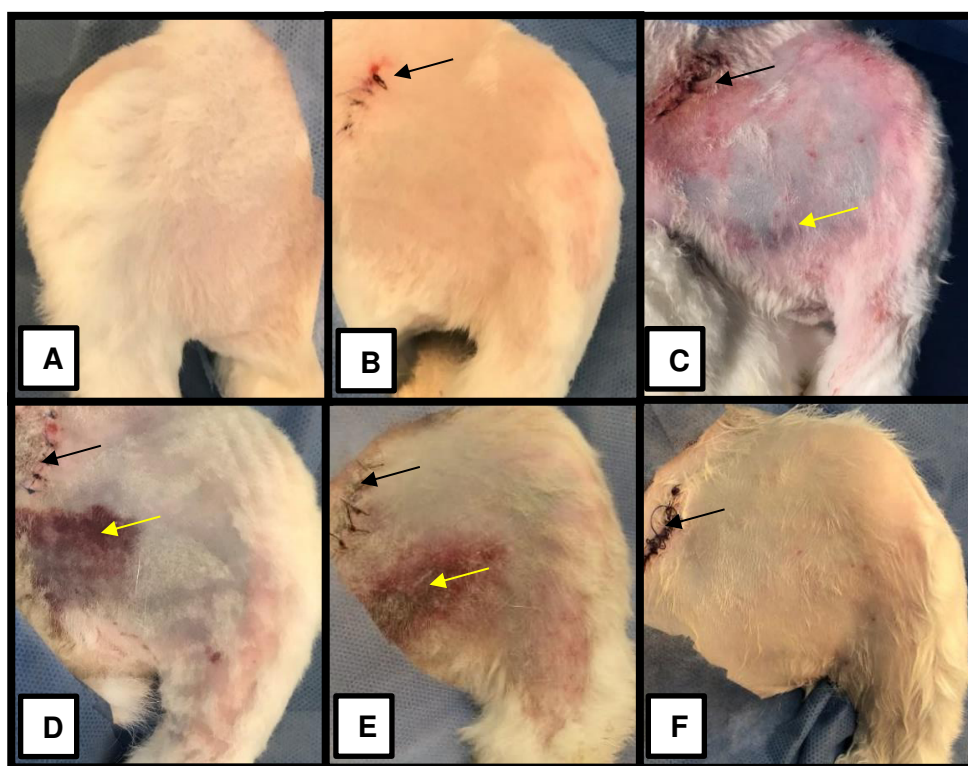


Fig. 13. Una Dosis Alta de HYAL previene los cambios macroscópicos ocasionados por el embolismo. A) Control Sano. Se observa de aspecto y coloración normal. B) Control quirúrgico. Se observa coloración y aspecto normal, adecuada cicatrización de la herida quirúrgica. C) Control de Embolismo. Se observa eritema, equimosis y hematomas, mala cicatrización de la herida quirúrgica. D) Embolismo/75UI HYAL. Se observa equimosis y adecuada cicatrización de la herida quirúrgica. E) Embolismo/200UI HYAL. Se observa equimosis de menor tamaño y adecuada cicatrización de la herida quirúrgica. F) Embolismo/500UI HYAL. Se observa de aspecto y coloración normal, adecuada cicatrización de la herida quirúrgica. Herida quirúrgica (flechas negras), hematoma/equimosis (flechas amarillas).

Al realizar la comparación de hallazgos clínicos, se observó que los grupos tratados con HYAL presentaron menor disminución del volumen muscular y mejor movilidad de la extremidad previo a la eutansia, en comparación con el grupo Control de Embolismo. Sin embargo, el grupo tratado con 500UI HYAL presentó una mejoría en el cambio de coloración de la piel y en el dolor previo a la eutanasia, en comparación con el grupo Control de Embolismo (Tabla 4).

Tabla 4. Tabla semicuantitativa de hallazgos clínicos de grupos control y tratados con HYAL al 4° día posterior al abordaje quirúrgico.

HALLAZGOS	CONTROL SANO n=3	CONTROL QUIRÚRGICO n=3	EMBOLISMO (HA) n=3	EMBOLISMO/ 75UI HYAL n=3	EMBOLISMO/ 200UI HYAL n=3	EMBOLISMO/ 500UI HYAL n=3
Cambio de coloración	-	+	+++	+++	+++	+
Disminución del volumen muscular	-	-	+++	++	++	++
Dolor previo a eutanasia	-	-	+++	+++	+++	++
Movilidad de extremidad	+++	+++	++	+++	+++	+++

/ - Ausente / + Leve / ++ Moderado / +++ Severo/

3.1.7 CAMBIOS ARTERIALES POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE HYAL.

Al evaluar la luz arterial posterior a la aplicación de HYAL, se observó que el émbolo no desapareció por completo en ningún grupo tratado (Fig. 14E-6); sin embargo, se observó una ligera disminución en el grupo tratado con Dosis Alta (500UI HYAL) (Fig. 14G). Al evaluar la pared arterial de los grupos tratados, se observó que el grupo tratado con Dosis Baja (75UI HYAL) conservó el grosor y la morfología normal de las tunicas arteriales, a excepción de la túnica media en la que se observaron zonas de hemorragia entre las fibras musculares lisas, sin embargo sus láminas elásticas interna y externa se observaron íntegras y fenestradas, a diferencia del grupo Control de Embolismo. Los grupos tratados con Dosis Media y Alta (200 y 500UI HYAL) preservaron la morfología normal de todas sus tunicas arteriales, así como de sus láminas elásticas interna y externa (Fig. 15). Los datos anteriores se confirmaron con la Tinción de Tricrómico de Masson (Fig. 17) y Orceína (Fig. 16).

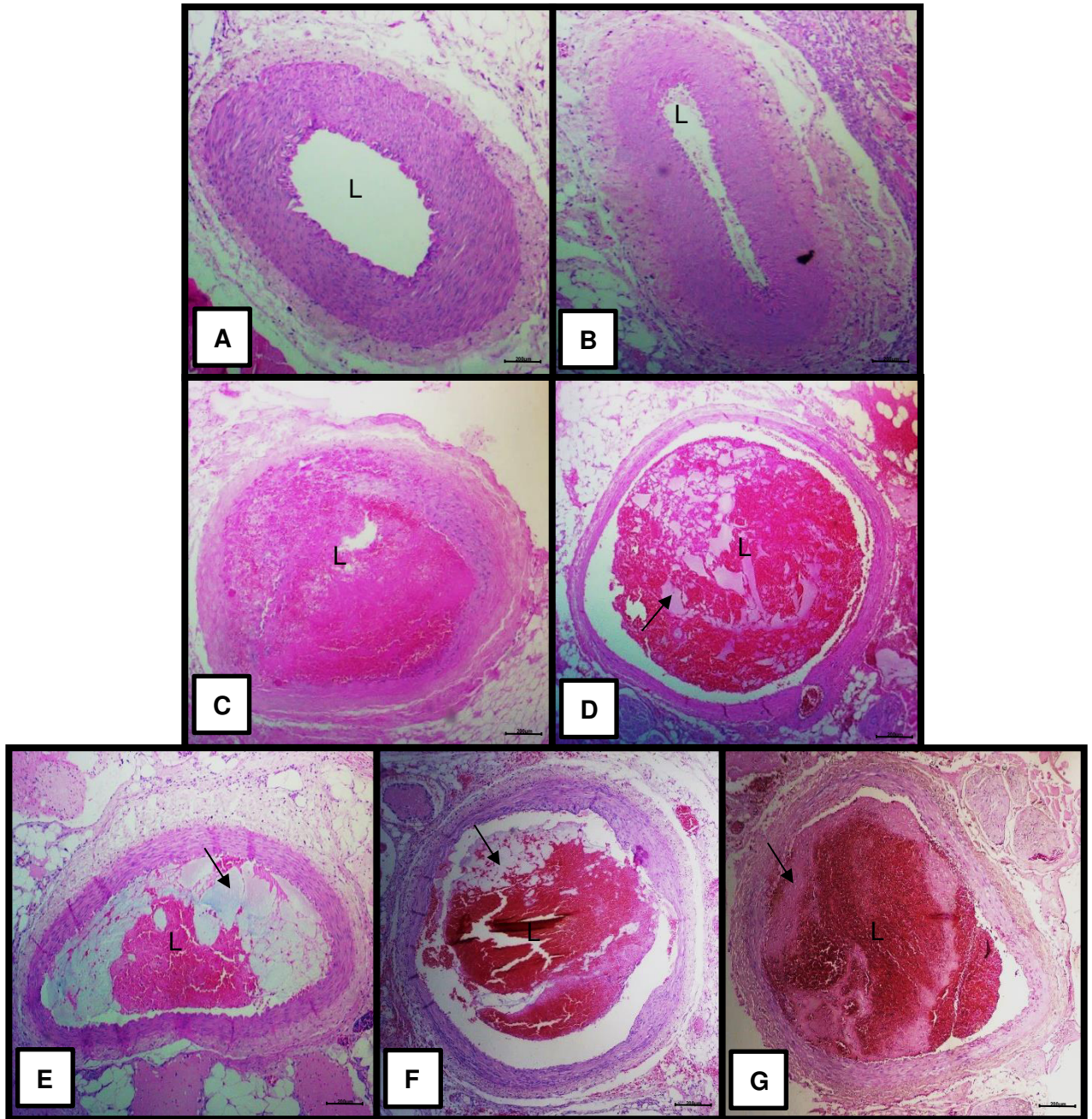


Fig. 14. El grupo de embolismo tratado con Dosis Alta (500UI HYAL) presenta una ligera disminución del émbolo. A) Arteria femoral del grupo Control Sano. Se observa la luz arterial limpia. B) Arteria femoral del grupo Control Quirúrgico. Se observa la luz arterial limpia. C) Arteria femoral grupo Control de Embolismo. Se observa trombosis arterial con ausencia de HA en la luz. La luz arterial se observa ocluida en su totalidad. D) Arteria femoral del grupo Control Embolismo. Se observa la luz arterial ocluida por abundante HA y eritrocitos. E) Arteria femoral del grupo Embolismo/75UI HYAL. Se observa la luz arterial ocluida por HA y eritrocitos. F) Arteria femoral del grupo Embolismo/200UI HYAL. Se observa la luz arterial ocluida pero con menor cantidad de HA. G) Arteria femoral del grupo Embolismo/500UI HYAL. Se observa la luz arterial ocluida con menor cantidad de HA. Luz arterial (L), HA (flechas negras). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Barra 200µm.

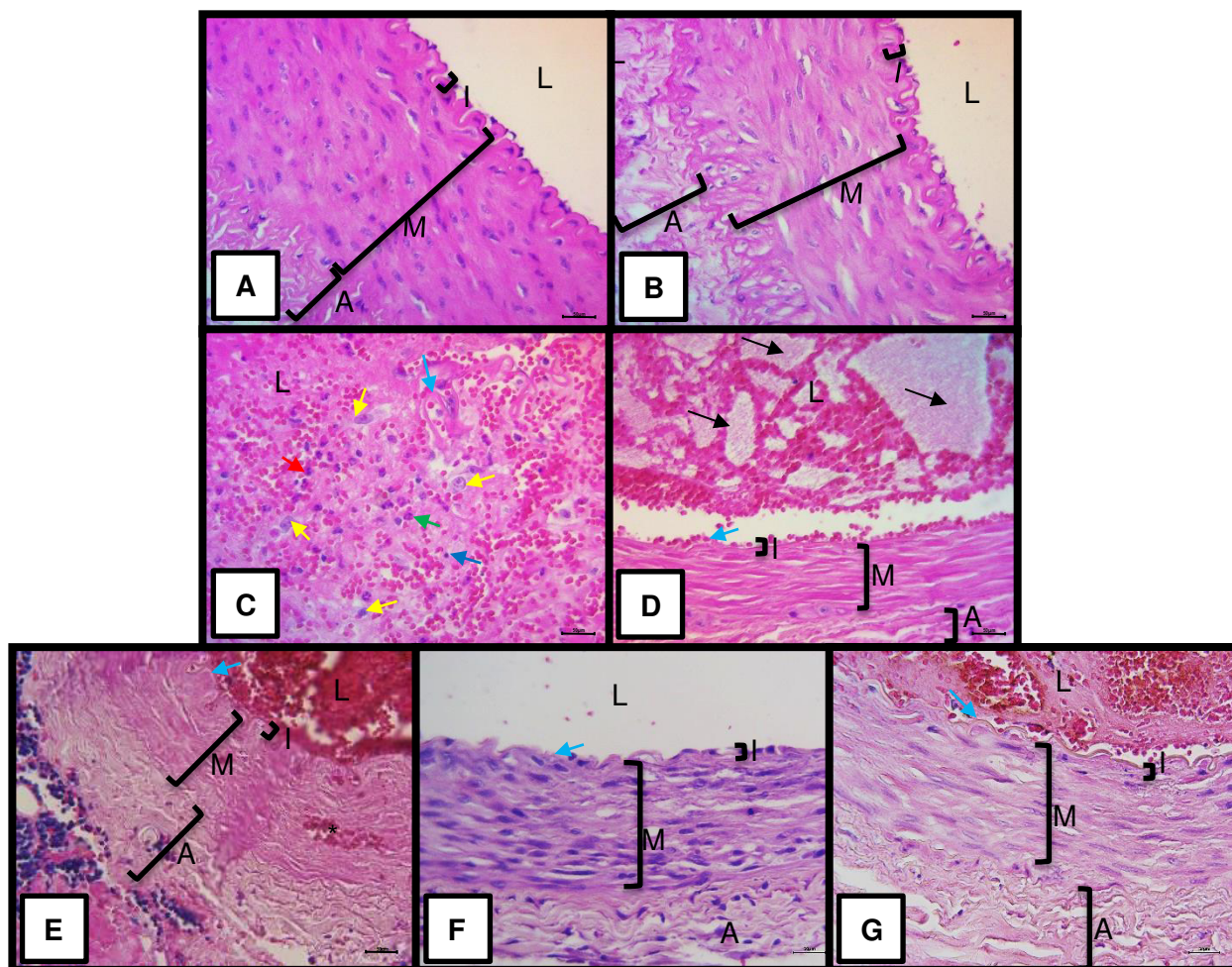


Fig. 15. Los grupos de embolismo tratados con Dosis Media y Alta (200UI y 500UI HYAL) no presentan cambios estructurales en la pared arterial. A) Pared arterial del grupo Control Sano. Se observan las tunicas íntima, media y la adventicia íntegras, la lámina elástica interna y el endotelio se observan de morfología normal. B) Pared Arterial del grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el grupo Control Sano. C) Pared arterial del grupo Control de Embolismo con trombosis. No se distinguen las tunicas arteriales, la lámina elástica interna se observa rota, y el endotelio desprendido. Se observa abundante infiltrado inflamatorio, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos. D) Arteria Femoral del grupo Control de Embolismo con abundante HA. Se observan las tunicas arteriales preservadas pero disminuidas en grosor. Las láminas elásticas interna y externa pierden su morfología normal y no se observa fenestrada. E) Pared arterial del grupo de Embolismo/75UI HYAL. Se observan las tunicas preservadas pero se observan zonas de hemorragia en la túnica media. La lámina elástica interna se observa de morfología normal. F) Pared arterial del grupo Embolismo/200UI HYAL. Se observan preservadas las tunicas arteriales, la lámina elástica interna de morfología normal. F) Pared arterial del grupo Embolismo/500UI HYAL. Se observan las tunicas arteriales preservadas e íntegras, la lámina elástica interna de morfología normal. Lámina elástica interna (fecha celeste), luz arterial (L), HA (flechas negras), macrófagos (flecha amarilla), linfocitos (flecha azul), eosinófilos (flecha roja), neutrófilos (flecha verde), hemorragia (*). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Barra 50µm.

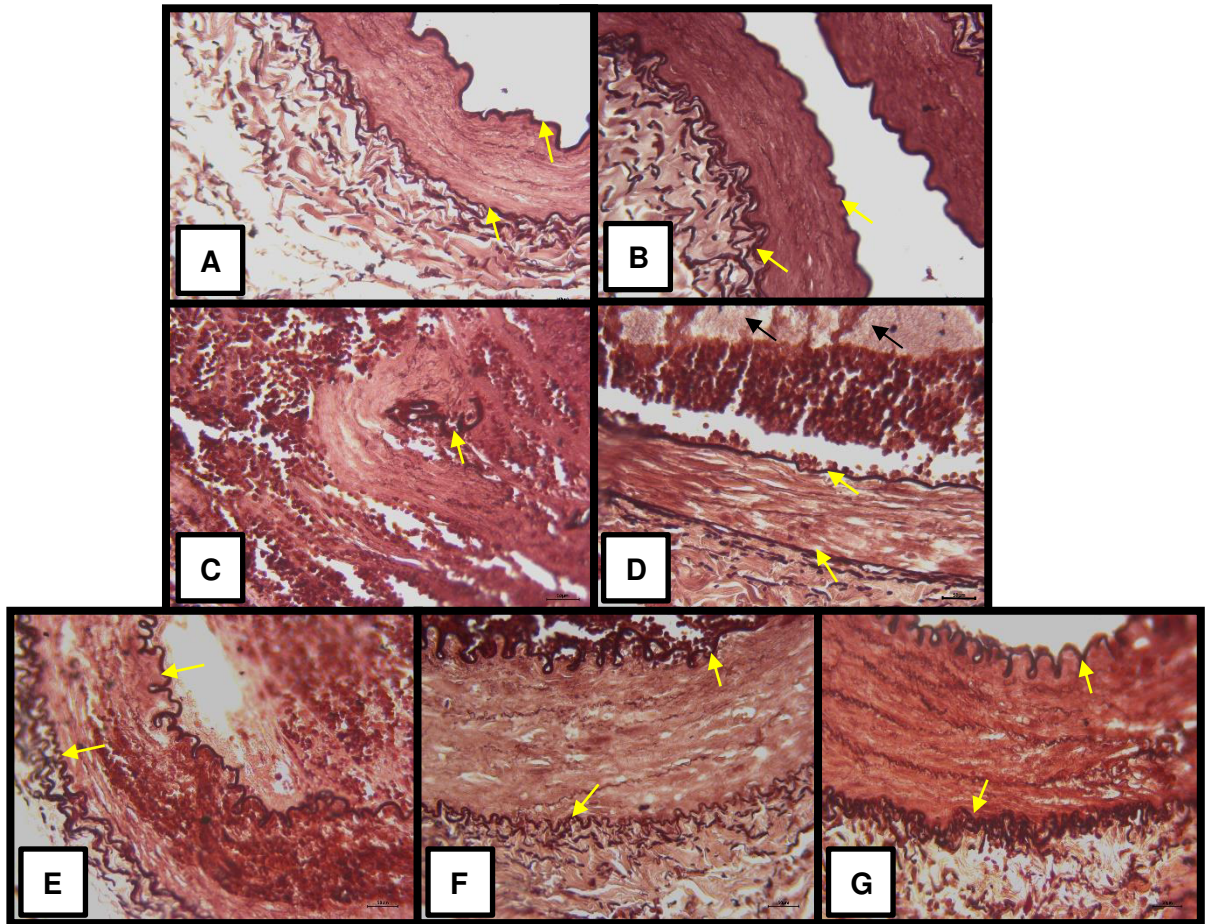


Fig. 16. Las fibras elásticas de la pared arterial de los grupos de embolismo tratados con HYAL preservan su morfología normal. A) Pared arterial del grupo Control Sano. Se observan las láminas elásticas interna y externa fenestradas, de morfología normal. B) Pared arterial del grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el grupo Control Sano. C) Pared arterial del grupo Control de Embolismo con trombosis. Se observa la lámina elástica interna rota. D) Pared arterial del grupo Control de Embolismo con HA. Se observan las láminas elásticas interna y externa preservadas pero pierden su fenestración normal. E) Pared arterial del grupo Embolismo/75UI HYAL. Se observa la lámina elástica interna y externa preservadas y fenestradas. F) Pared arterial del grupo Embolismo/200UI HYAL. Se observan las láminas elásticas interna y externa preservadas y fenestradas. G) Pared arterial del grupo Embolismo/500UI HYAL. Se observan las láminas elásticas interna y externa preservadas y fenestradas. Láminas elásticas interna y externa (flechas amarillas), HA (flechas negras). Tinción: Orceína. Barra 50µm.

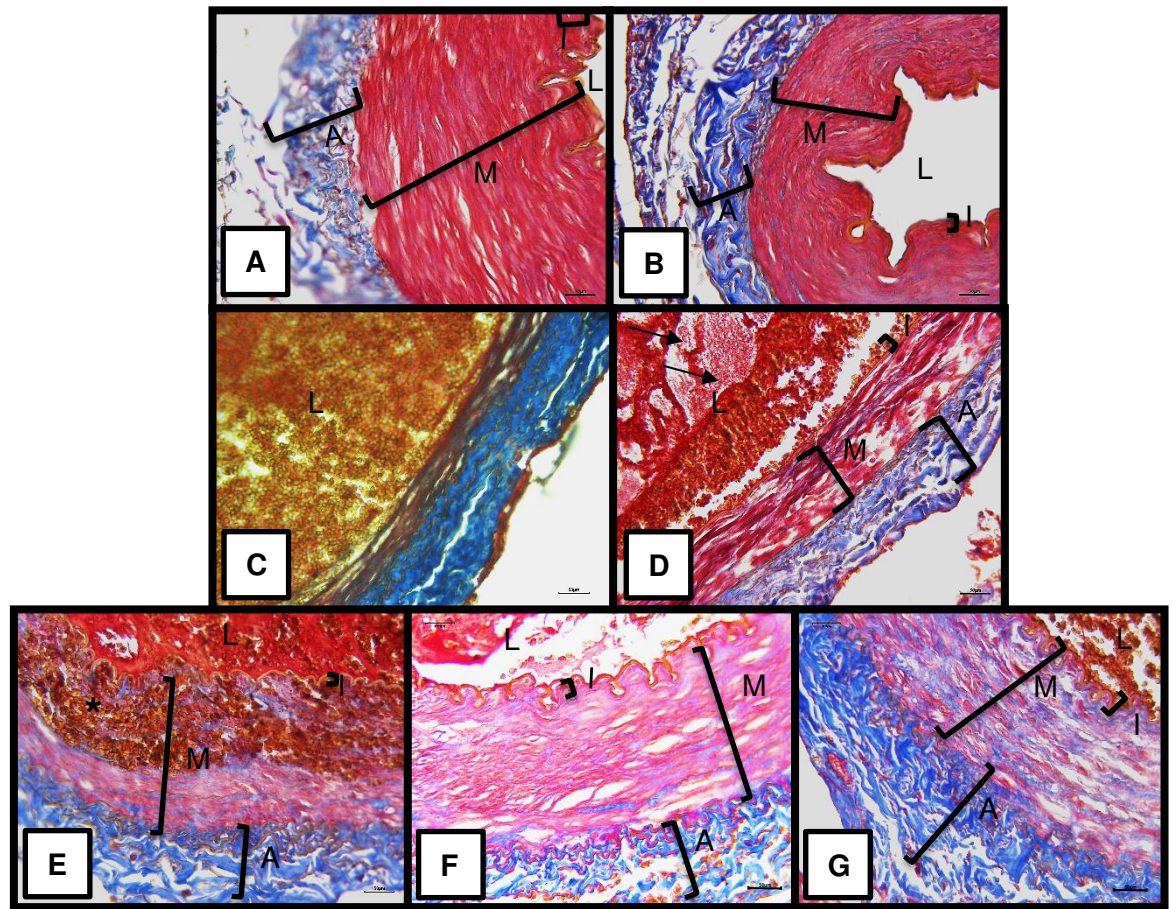


Fig. 17. Confirmación de la mejoría parcial de la pared arterial de los grupos de embolismo tratados con Dosis Media y Alta (200UI y 500UI HYAL). A) Pared arterial del grupo Control Sano. Se observan las tunicas íntima, media y adventicia de morfología normal. El músculo liso se observa de color rojo y las fibras de colágeno de la túnica adventicia de color azul. B) Pared Arterial del grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el grupo Control Sano. C) Pared arterial del grupo Control de Embolismo con trombosis. Se observan rotas las tunicas íntima y media. El músculo liso se observa de color rojo y las fibras de colágeno de la túnica adventicia de color azul. D) Pared arteria del grupo Control de Embolismo con HA. Se observan las tunicas arteriales preservadas pero disminuidas en grosor. El músculo liso se observa de color rojo y las fibras de colágeno de la túnica adventicia de color azul. E) Pared arterial del grupo Embolismo/ 75UI HYAL Se observa una zona de hemorragia grande en la túnica media, la túnica adventicia se encuentra preservada. F) Pared arterial del grupo Embolismo/ 200UI HYAL. Se observan las tunicas arteriales íntegras, con adecuado grosor. G) Pared arterial del grupo Embolismo/ 500UI HYAL. Se observan las tunicas arteriales preservadas e íntegras con adecuado grosor. Luz arterial (L), HA (flechas negras), tunicas íntima (I), media (M), adventicia (A). Tinción: Tricrómico de Masson. Barra 50µm.

3.1.8 DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LOS GRUPOS TRATADOS CON 200UI Y 500UI HYAL Y EL GRUPO DE EMBOLISMO.

La presencia de HA en los grupos de embolismo tratados con HYAL se confirmó con el método histoquímico de Azul Alcían, en el que se observó el HA de color azul en la luz arterial de todos los grupos tratados; sin embargo, se observó una disminución de la cantidad de HA en la luz arterial en el grupo tratado con 500UI HYAL (Fig. 18).

Se realizó la cuantificación de HA con el programa de Image J V.1.51, y posteriormente se realizó el análisis estadístico con el programa de SPSS V.21. Se observó una diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) entre los grupos Control Sano y Control Quirúrgico, y el grupo Control de Embolismo, de esta forma se reafirmó el establecimiento del modelo lagomorfo de embolismo (Tabla 5). Además, se encontró diferencia significativa entre los grupos Control de Embolismo y los grupos tratados con 200UI y 500UI HYAL; sin embargo, en la cuantificación de HA no se observó diferencia significativa entre 200UI y 500UI HYAL (Gráfica 1).

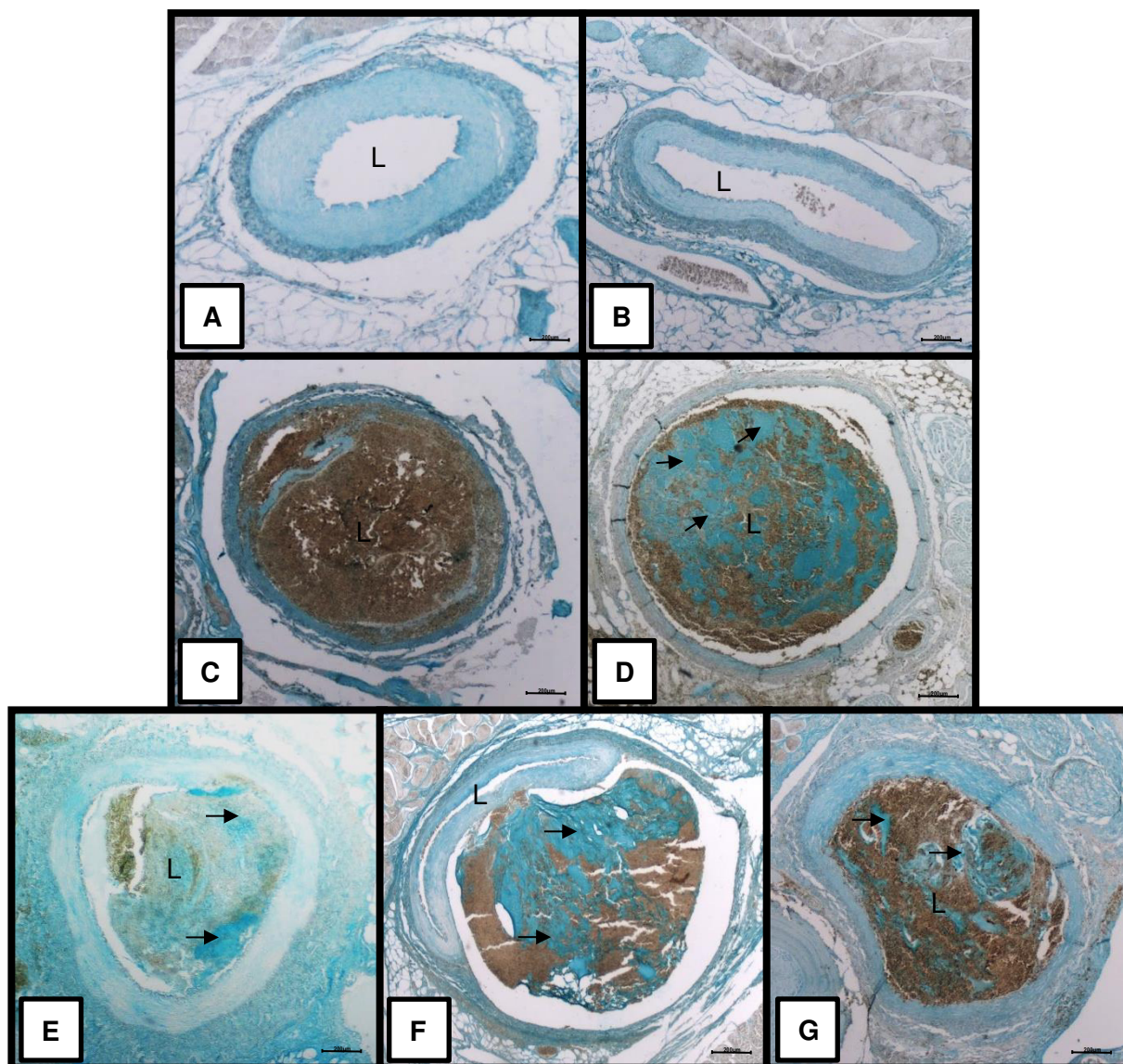


Fig. 18. El grupo de embolismo tratado con Dosis Alta (500UI HYAL) presenta menor cantidad de HA en la luz arterial. A) Arteria femoral del grupo Control Sano. Se observa la luz arterial limpia. B) Arteria femoral grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el grupo Control Sano. C) Arteria femoral del grupo Control de Embolismo con trombosis. Se observa la luz arterial obstruida en su totalidad por eritrocitos, las tunicas íntima y media se observan desprendidas de color celeste en la luz arterial. D) Arteria femoral del grupo Control de Embolismo. Se observa la luz arterial obstruida por abundante HA de color azul y eritrocitos. E) Arteria femoral del grupo Embolismo/75UI HYAL. Se observa la luz arterial con presencia de HA abundante de color azul. F) Arteria femoral del grupo Embolismo/200UI HYAL. Se observa el HA abundante de color azul entre la túnica media y la adventicia, además de abundantes eritrocitos. G) Arteria femoral del grupo Embolismo/500UI HYAL. Se observa HA de color azul en la luz arterial en menor cantidad y abundantes eritrocitos. Histoquímica: Azul Alcían. Luz arterial (L), HA (flecha negra). Barra 200µm.

Tabla 5. Análisis estadístico de la cuantificación de HA.

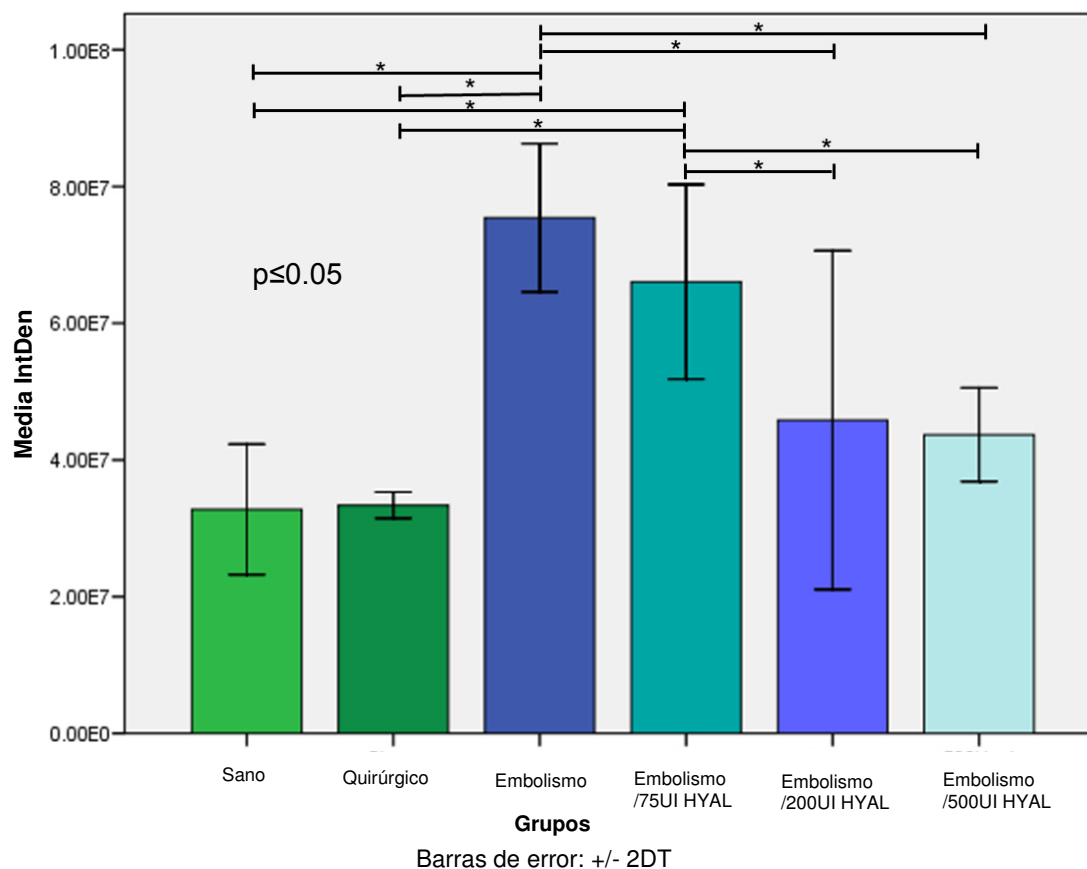
Comparaciones múltiples

Variable dependiente: IntDen

Bonferroni

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Sano	Quirúrgico	-617044.000	5467258.1	1.000	-20566463.4	2E+007
	Embolismo	-42667228.7*	5467258.1	.000	-62616648.1	-2E+007
	75UI HYAL	-33301328.7*	5467258.1	.001	-53250748.1	-1E+007
	200UI HYAL	-13072880.3	5467258.1	.511	-33022299.8	6876539
	500UI HYAL	-10932782.0	5467258.1	1.000	-30882201.4	9016637
Quirúrgico	Sano	617044.0000	5467258.1	1.000	-19332375.4	2E+007
	Embolismo	-42050184.7*	5467258.1	.000	-61999604.1	-2E+007
	75UI HYAL	-32684284.7*	5467258.1	.001	-52633704.1	-1E+007
	200UI HYAL	-12455836.3	5467258.1	.627	-32405255.8	7493583
	500UI HYAL	-10315738.0	5467258.1	1.000	-30265157.4	9633681
Embolismo	Sano	42667228.67*	5467258.1	.000	22717809.23	6E+007
	Quirúrgico	42050184.67*	5467258.1	.000	22100765.23	6E+007
	75UI HYAL	9365900.000	5467258.1	1.000	-10583519.4	3E+007
	200UI HYAL	29594348.33*	5467258.1	.002	9644928.8921	5E+007
	500UI HYAL	31734446.67*	5467258.1	.001	11785027.23	5E+007
75UI HYAL	Sano	33301328.67*	5467258.1	.001	13351909.23	5E+007
	Quirúrgico	32684284.67*	5467258.1	.001	12734865.23	5E+007
	Embolismo	-9365900.00	5467258.1	1.000	-29315319.4	1E+007
	200UI HYAL	20228448.33*	5467258.1	.046	279028.8921	4E+007
	500UI HYAL	22368546.67*	5467258.1	.022	2419127.2254	4E+007
200UI HYAL	Sano	13072880.33	5467258.1	.511	-6876539.11	3E+007
	Quirúrgico	12455836.33	5467258.1	.627	-7493583.11	3E+007
	Embolismo	-29594348.3*	5467258.1	.002	-49543767.8	-9644929
	75UI HYAL	-20228448.3*	5467258.1	.046	-40177867.8	-279029
	500UI HYAL	2140098.333	5467258.1	1.000	-17809321.1	2E+007
500UI HYAL	Sano	10932782.00	5467258.1	1.000	-9016637.44	3E+007
	Quirúrgico	10315738.00	5467258.1	1.000	-9633681.44	3E+007
	Embolismo	-31734446.7*	5467258.1	.001	-51683866.1	-1E+007
	75UI HYAL	-22368546.7*	5467258.1	.022	-42317966.1	-2419127
	200UI HYAL	-2140098.33	5467258.1	1.000	-22089517.8	2E+007

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.



Gráfica 1. Los grupos de embolismo tratados con Dosis Media y Alta (200UI y 500UI HYAL) presentan menor cantidad de HA en comparación con los grupos Control de Embolismo y de embolismo tratado con Dosis Baja (75UI HYAL). Se observa diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) entre los grupos Control Sano y Quirúrgico, y el grupo Control de Embolismo. Así como entre el grupo Control de Embolismo y los grupos de embolismo tratados con Dosis Media y Alta (200UI y 500UI HYAL). No se observó diferencia estadística significativa entre los grupos de embolismo tratados con Dosis Media y Alta (200UI y 500UI HYAL).

3.1.9 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN TEJIDOS ADYACENTES POSTERIOR A LA APLICACIÓN EXTRAVASCULAR DE HYAL.

Se analizaron los tejidos adyacentes a la arteria, en la imagen panorámica se observó que en los grupos Control Sano y Control Quirúrgico, se distinguen la arteria femoral con su luz limpia, además de observarse el músculo esquelético, nervio y tejido adiposo de apariencia normal (Fig. 19A1 y B1). El nervio de ambos grupos posee una morfología normal, rodeado de un epineurio de grosor adecuado, así como una buena organización de los fascículos nerviosos y axones (Fig. 19A2 y B2). El tejido adiposo de ambos grupos presenta su morfología normal: adipocitos poliédricos con núcleos a la periferia y escaso citoplasma, no se aprecia infiltrado inflamatorio (Fig. 19A3 y B3). El músculo esquelético en ambos grupos se observa con fibras musculares de apariencia normal, bien organizadas, morfología poligonal, con núcleos a la periferia sin infiltrado inflamatorio (Fig. 20Ay B, Fig. 21A y B).

Sin embargo, en el grupo Control de Embolismo se observa en la imagen panorámica la arteria con la luz casi obstruida en su totalidad, así como la ubicación del nervio, músculo y tejido adiposo (Fig. 19C1). A mayor aumento se aprecia el nervio femoral y su epineurio disminuido en grosor, así como una pérdida de la organización de los fascículos nerviosos y sus axones, observándose muy separados entre sí (Fig. 19C2). El tejido adiposo se observa con abundante infiltrado inflamatorio y eritrocitos, se observan además escasos adipocitos que pierden su morfología poliédrica (Fig. 19C3). El músculo esquelético se observa con pérdida de la organización de las fibras musculares, pierden su morfología poligonal, y se observan muy separadas entre sí. Se observa además de abundante infiltrado inflamatorio (Fig. 20C y 21C).

En el grupo de embolismo tratado con 75UI HYAL, se observa la imagen panorámica en donde se aprecia la arteria femoral con su luz obstruida, y la ubicación de los tejidos circundantes a la misma (Fig. 19D1). A mayor aumento, se aprecia el nervio femoral con su morfología normal, epineurio de adecuado

grosor así como sus fascículos y axones con una adecuada organización (Fig. 19D2). El tejido adiposo se aprecia con abundante hemorragia e infiltrado inflamatorio; sin embargo, los adipocitos se observan con su forma poliédrica normal y núcleo en la periferia (Fig. 19D3). El músculo esquelético se observa aún con pérdida de la organización de las fibras musculares, muy escasas fibras conservan su morfología poligonal, además de abundante infiltrado inflamatorio (Fig. 20D y 21D).

En el grupo de embolismo tratado con 200UI HYAL, en la imagen panorámica se observa la organización de la arteria femoral y las estructuras adyacentes como nervio y músculo (Fig. 19E1). A mayor aumento, se observa el nervio femoral, el cual posee características similares a los grupos Control Sano, Quirúrgico y embolismo tratado con 75UI HYAL (Fig. 19E1). El nervio femoral se observa de morfología normal (Fig. 19E2), el tejido adiposo presenta cambios ya que se aprecia menor infiltrado inflamatorio y mejor organización del tejido conectivo laxo (Fig. 19E3). El músculo esquelético se observa con mejor organización de las fibras, sin embargo, se observa aún lisis muscular e infiltrado inflamatorio (Fig. 20E y 21E).

En el grupo de embolismo tratado con 500UI HYAL, se aprecia una disminución de los efectos ocasionados por el embolismo, el nervio se observa de forma similar al Control Sano, Quirúrgico y embolismo tratados con HYAL (Fig. 19F1); sin embargo, el cambio es más evidente en el tejido adiposo, los adipocitos conservan su morfología poliédrica y el tejido conectivo laxo que los rodea presenta escasos eritrocitos, sin infiltrado inflamatorio (Fig. 19F3). El músculo esquelético se observa con mejor organización de las fibras musculares, con menor separación entre ellas, y mayor cantidad de fibras preservan su morfología poligonal con núcleos a la periferia. Se observa menor cantidad de lisis muscular, y menor infiltrado inflamatorio (Fig. 20F y 21F). De esta forma observamos que el grupo tratado con 500UI HYAL evita parcialmente el daño causado por el embolismo en los tejidos adyacentes.

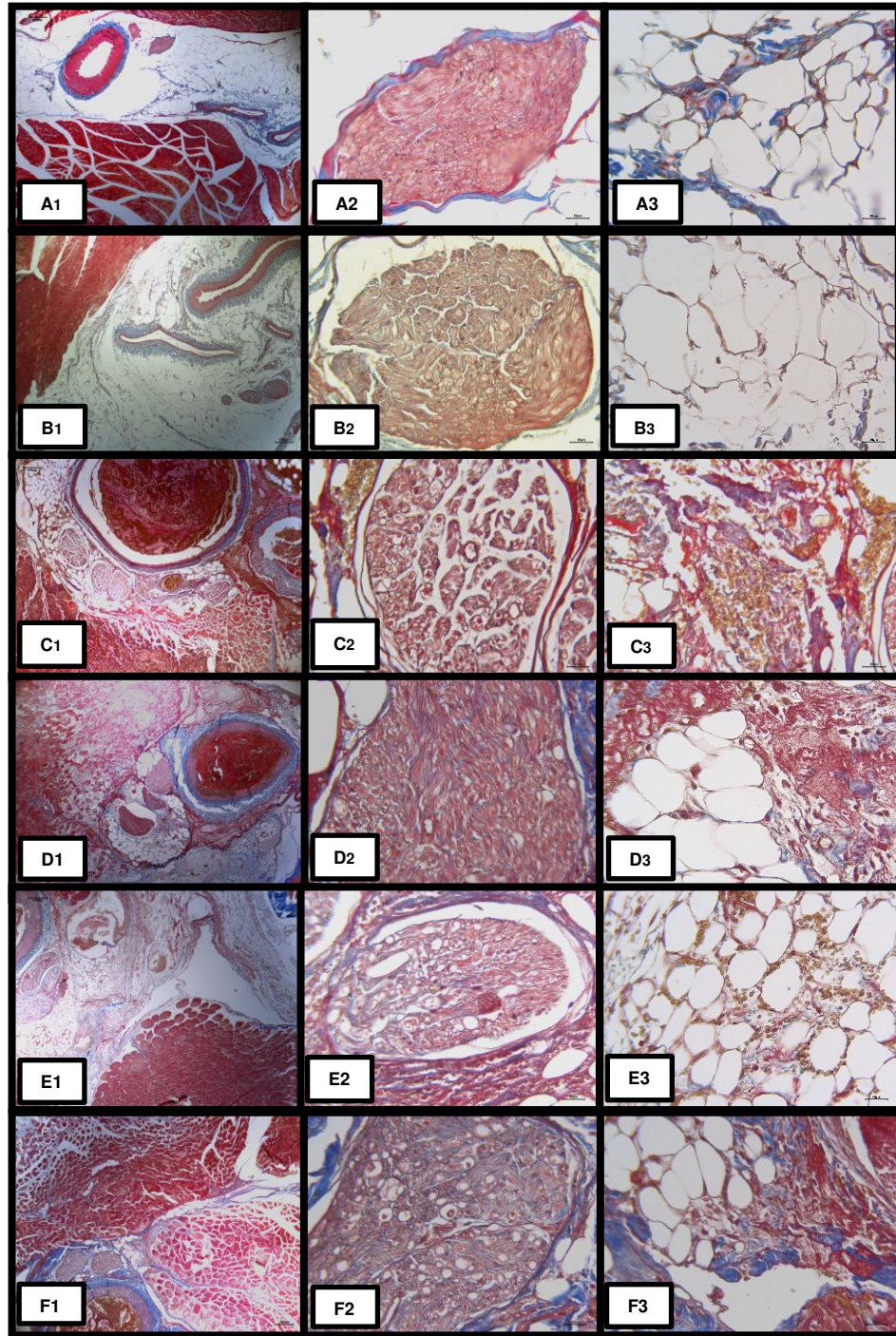


Fig. 19. El grupo de embolismo tratado con Dosis Alta (500UI HYAL) evita parcialmente el daño en los tejidos adyacentes a la arteria. A) Control Sano. B) Control Quirúrgico. C) Control de Embolismo. D) Embolismo/75UI HYAL. E) Embolismo/200UI HYAL. F) Embolismo/500UI HYAL. 1) Imagen panorámica. 2) Nervio Femoral. 3) Tejido adiposo. Tinción: Tricrómico de Masson. Barra 200µm y 50µm.

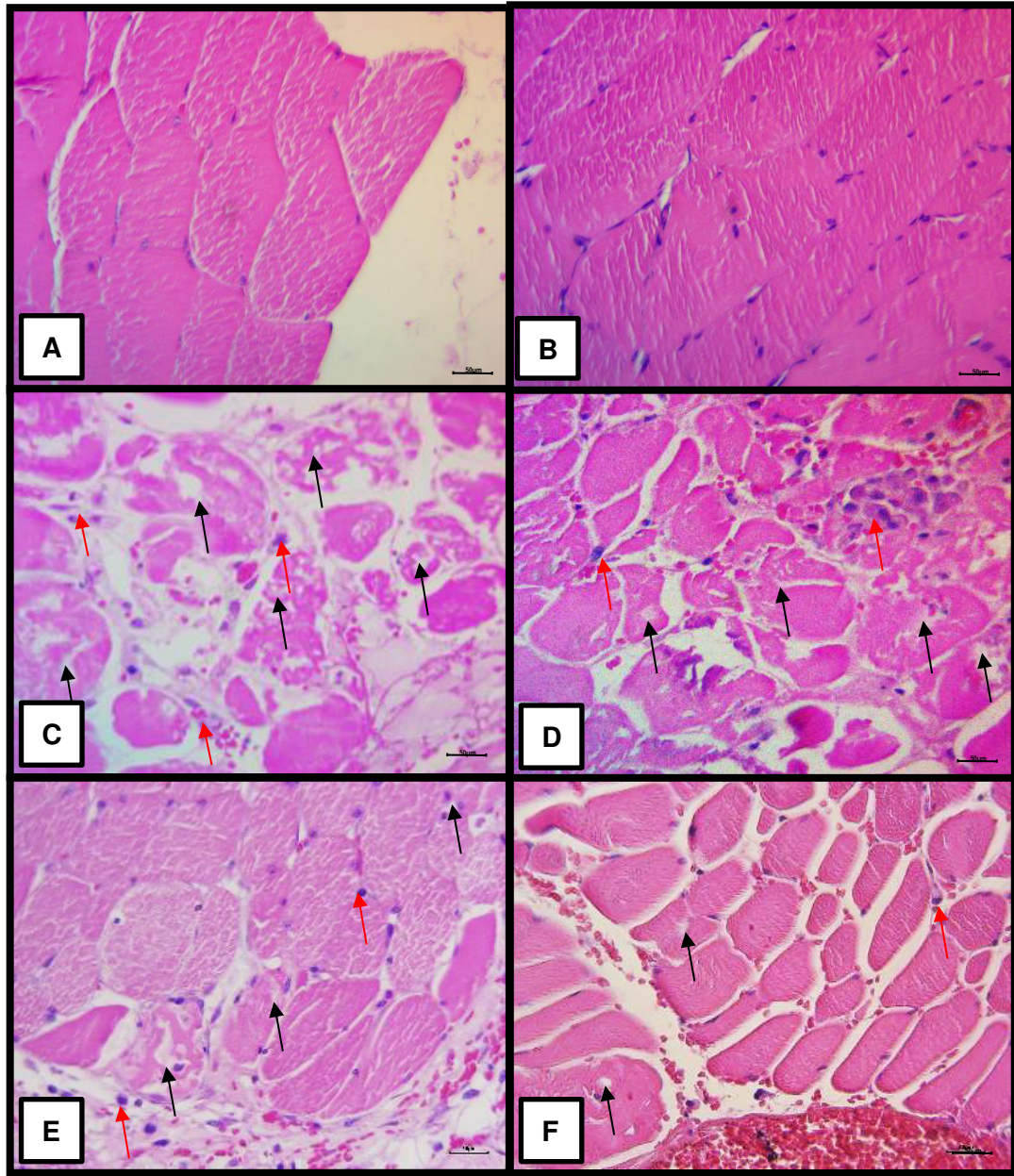


Fig. 20. La Dosis Alta (500UI HYAL) evita parcialmente el daño al músculo esquelético ocasionado por el embolismo. A) Músculo esquelético del grupo Control Sano. Se observan las fibras musculares de forma poligonales, con buena organización y núcleos a la periferia. B) Músculo esquelético del grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el Control Sano. C) Músculo esquelético del grupo Control de Embolismo. Se observan las fibras musculares muy separadas entre sí, además de lisis y abundante infiltrado inflamatorio. D) Músculo esquelético del grupo Embolismo/ 75UI HYAL. Se observan las fibras musculares desorganizadas con infiltrado inflamatorio, y escasas fibras conservan su morfología poligonal. E) Músculo esquelético del grupo Embolismo/ 200UI HYAL. Se observan fibras musculares mejor organizadas, menor lisis e infiltrado inflamatorio. F) Músculo esquelético del grupo Embolismo/ 500UI HYAL. Se observa disminución de la lisis muscular, las fibras preservan su morfología poligonal casi en su totalidad; se observa menor infiltrado inflamatorio. Infiltrado inflamatorio (flechas rojas), lisis (flechas negras). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Barra 50µm.

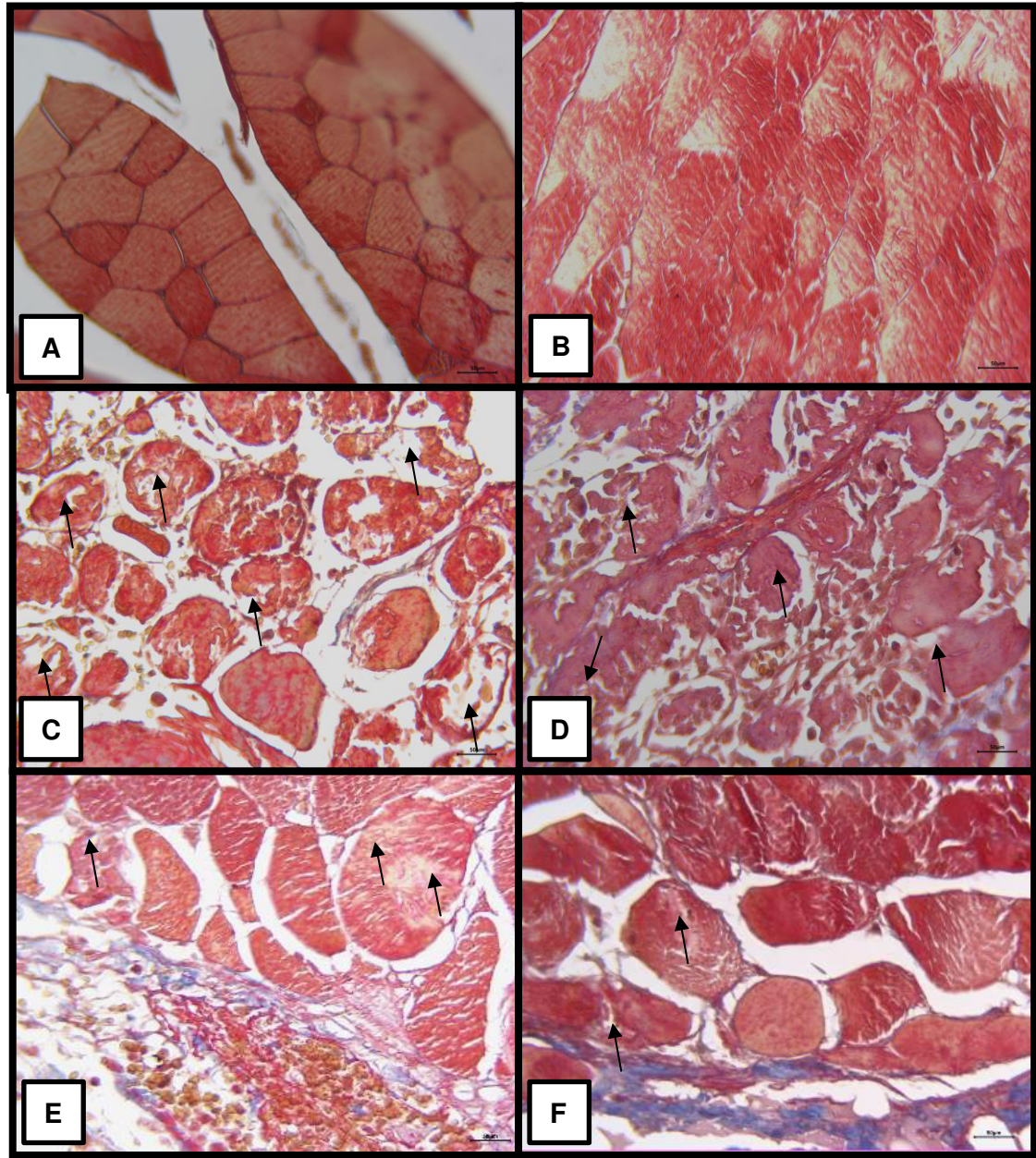


Fig. 21. Confirmación del efecto de una Dosis Alta (500UI HYAL) en un modelo de embolismo al evitar parcialmente los daños sobre el músculo esquelético ocasionados por el embolismo. A) Músculo esquelético del grupo Control Sano. Se observan las fibras musculares de forma poligonal, con buena organización y núcleos a la periferia. B) Músculo esquelético del grupo Control Quirúrgico. Se observan los mismos hallazgos que en el grupo Control Sano. C) Músculo esquelético del grupo Control de Embolismo. Se observan las fibras musculares muy separadas entre sí, además de abundante lisis. D) Músculo esquelético del grupo de Embolismo/75UI HYAL. Se observan las fibras musculares desorganizadas y con lisis, además de escasas fibras que conservan su morfología poligonal. E) Músculo esquelético del grupo Embolismo/200UI HYAL. Se observa una mejor organización de las fibras musculares, mayor cantidad de fibras que conservan su morfología poligonal, y menor lisis. F) Músculo esquelético del grupo Embolismo/500UI HYAL. Se observa escasa lisis muscular, las fibras preservan su organización y morfología poligonal casi en su totalidad. Tinción: Tricrómico de Masson. Lisis (flechas negras). Barra 50µm.

3.1.10 UNA DOSIS ALTA DE HYAL (500UI) APLICADA DE FORMA SC NO ALTERA LA MORFOLOGÍA DE LA PIEL.

Debido a que la aplicación de HYAL se realizó de forma SC, se evaluó si ésta tenía algún efecto adverso sobre la piel. El grupo Control de Embolismo, al cual no se le aplicó el tratamiento con HYAL presentó cambios en la piel. La epidermis se observó aumentada de espesor, la dermis papilar y la dermis reticular se observaron con abundante infiltrado inflamatorio. Las glándulas sebáceas mostraron aumento de tamaño (Fig. 22C).

Al comprar los grupos Control Sano y Quirúrgico con los grupos de embolismo tratados con HYAL, observamos las mismas características en todos los grupos (Fig. 22): epidermis de aspecto y espesor normal, dermis papilar y reticular de morfología normal sin infiltrado inflamatorio. El tejido conectivo denso se observó con adecuada organización de las fibras de colágeno. Las glándulas sebáceas se encontraron de tamaño y aspecto normal. De acuerdo con estos resultados, ninguna de la dosis de HYAL utilizada como tratamiento afecta la morfología normal de la piel.

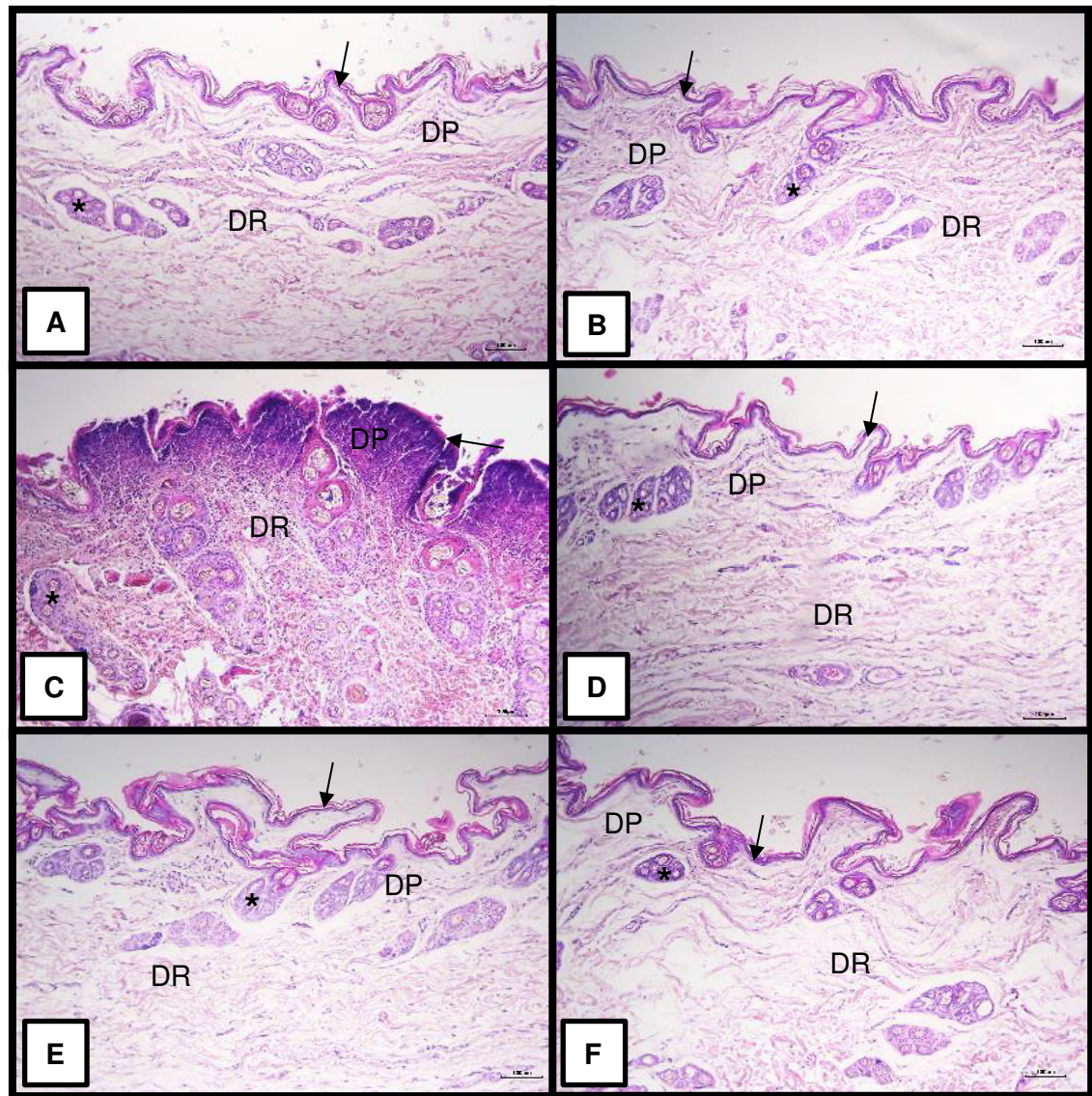


Fig. 22. La aplicación de HYAL (500UI) SC altera la morfología normal de la piel. A) Piel del grupo Control Sano. Epidermis de grosor y apariencia normal, dermis papilar y reticular sin infiltrado inflamatorio. Glándulas sebáceas de aspecto y tamaño normal. B) Piel del grupo Control Quirúrgico. Mismos hallazgos que el Control Sano. C) Piel del grupo Control de Embolismo. Epidermis engrosada, dermis papilar y reticular con abundante infiltrado inflamatorio, glándulas sebáceas aumentadas de tamaño. D, E y F) Piel de los grupos Embolismo/75UI, 200UI y 500UI HYAL. Mismos hallazgos que el Control Sano. Epidermis (flechas negras). Dermis papilar (DP). Dermis reticular (DR), Glándulas sebáceas (*) Tinción: Hematoxilina y Eosina. Barra 200µm.

3.1.11 UNA DOSIS ALTA DE HYAL (500UI) NO CAUSA CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA ARTERIA Y TEJIDOS SUBYACENTES EN UNA EXTREMIDAD SANA.

Se realizó la evaluación de una Dosis Alta de HYAL (500UI) aplicada de forma SC para conocer si ésta tenía algún efecto adverso en la arteria y tejidos adyacentes en una extremidad sana.

De manera interesante no se observaron cambios en la pared arterial: las túnica íntima, media y adventicia se observaron preservadas e íntegras. El endotelio se observó normal así como la lámina elástica interna (Fig. 23A). El nervio se observó de apariencia normal, epineurio de grosor adecuado, fascículos y axones con organización normal (Fig. 23B). El músculo esquelético mostró morfología poligonal, núcleos a la periferia, adecuada organización de las fibras sin infiltrado inflamatorio (Fig. 23C). El tejido adiposo se observó normal, sin cambios en su morfología poliédrica y núcleos a la periferia con escaso citoplasma, tampoco presentó infiltrado inflamatorio (Fig. 23D).

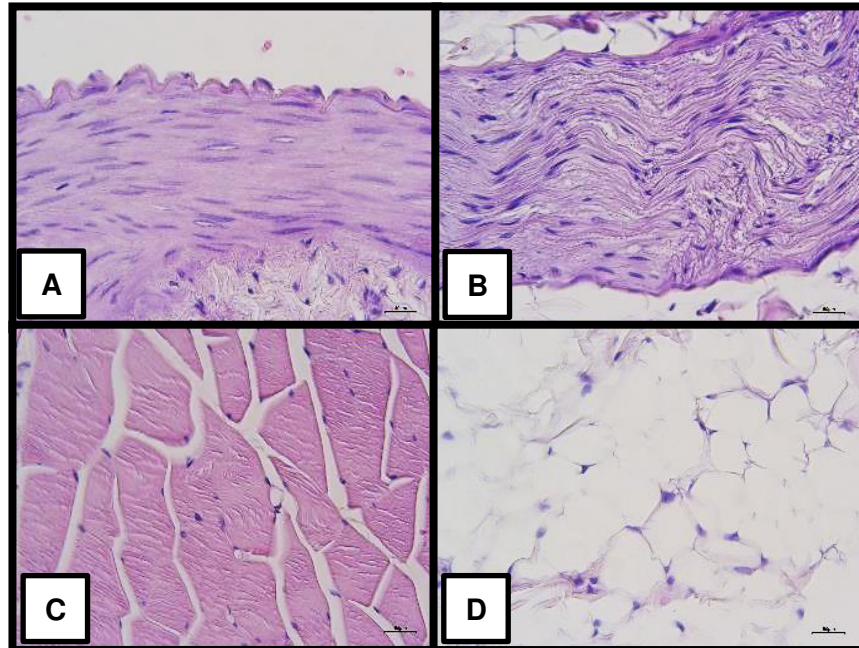


Fig. 23. La HYAL (500UI) SC no causa cambios morfológicos en los tejidos de una extremidad sana. A) Pared arterial de apariencia normal, túnica preservadas e íntegras. B) Nervio femoral. Se observa con adecuada organización de fascículos y axones. C) Músculo esquelético. Se observa con adecuada organización de las fibras, morfología poligonal normal con núcleos a la periferia. D) Tejido adiposo. Se observa de morfología poliédrica normal, escaso citoplasma, sin infiltrado inflamatorio. Tinción: Hematoxilina y Eosina. Barra 200µm.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Se estableció un modelo lagomorfo femoral de embolismo por HA, ya que los modelos actuales de embolismo por HA en oreja de conejo no cumplen con las características morfológicas similares a las del sitio de aplicación clínica: poseen piel más delgada y cartílago, escaso músculo esquelético y carece de tejido adiposo.

En este estudio se observó la distribución irregular del HA en la arteria femoral, y se localizó la presencia de HA en la luz de la vena femoral, similar a lo observado por Zhuang *et al.*, (2016) en la arteria auricular central ⁽³²⁾. También se observaron sitios de trombosis⁽³⁰⁾, similar a lo observado por Chang *et al.*, (2016); sin embargo, en nuestro estudio se caracterizaron morfológicamente no solo los cambios arteriales, sino también los de los tejidos circundantes.

A diferencia del modelo de Zhuang *et al.*, (2016) no se observó engrosado el endotelio de la arteria, pero sí desprendido. Similar a ellos, la túnica media se observó disminuida en su grosor en la porción de la arteria femoral con embolismo de HA⁽³²⁾. Similar a Maruyama (2017), se observó infiltrado inflamatorio en la dermis papilar y reticular en piel del grupo Control de Embolismo, además de la epidermis engrosada⁽¹⁹⁾.

Se observó una mejoría macroscópica en el grupo tratado con una Dosis Alta de HYAL (500UIHyal) al evaluar el efecto de tres concentraciones de HYAL sobre un émbolo de HA, similar a lo encontrado por Kim *et al.*, (2011), en donde evaluaron una dosis de 750UI de HYAL⁽²¹⁾.

Al realizar la cuantificación de HA no se observó diferencia significativa entre el grupo Control de Embolismo y el grupo de embolismo tratado con Dosis Baja

(75UI HYAL), lo cual pudiera deberse a que la dosis de 75UI HYAL no fue suficiente para una degradación significativa del émbolo. Sin embargo, si se observó diferencia significativa entre los grupos tratados con 200UI y 500UI HYAL, con el grupo Control de Embolismo; pero al comparar el grupo de 200UI y 500UI HYAL no se observó una diferencia estadística significativa. Esto pudo deberse al tamaño de la muestra y a la variabilidad de los datos encontrados en el grupo de 200UI HYAL debido a la distribución irregular del HA a lo largo de la arteria femoral⁽³²⁾ como el modelo de Zhuang *et al.*, (2016); o a la fuga del HA por el sitio de punción. Cabe destacar que entre los grupos tratados con 200UI HYAL y 500UI HYAL, comparados contra los grupos Control Sano y Quirúrgico, no se observó una diferencia estadística significativa. Esto probablemente se deba a que la Dosis de 200UI HYAL y 500UI HYAL presentan mayor similitud con los grupos Control Sano y Quirúrgico en la cantidad de HA.

Se observó que el grupo Control de HYAL tratado con 500UI sin la presencia del embolismo no presentaba degeneración del endotelio de la túnica íntima, ni separación de la túnica íntima y media; a diferencia de lo observado con la aplicación de HYAL IA⁽³⁴⁾ por Wattanakrai *et al.*, (2018).

Ninguna dosis fue suficiente para degradar totalmente el émbolo de HA, probablemente a causa de la cantidad de éste; o bien, que los tejidos adyacentes impidan que la HYAL llegue en cantidad suficiente a la arteria. Sin embargo, en la evaluación morfológica del grupo de Dosis Alta de HYAL (500UI) se observó una mejoría parcial en el músculo, dónde se observan las fibras musculares esqueléticas mejor conservadas, con escasa lisis y poco infiltrado inflamatorio. Las túnicas arteriales también se observan conservadas y el tejido subyacente con menor infiltrado inflamatorio. Esto probablemente se deba a que la concentración de 500UI HYAL, redujo parcialmente el émbolo en las arterias de menor calibre colaterales que dan irrigación al músculo.

Además, se encontraron sitios de trombosis arterial en los grupos de embolismo⁽³⁰⁾ y tratados con HYAL, debido a que el HA provoca estasis o turbulencia en el flujo arterial causando una disfunción endotelial, que desencadena la agregación plaquetaria, formación de una malla de fibrina y adhesión leucocitaria, similar a lo encontrado en el estudio de Chiang *et al.*, (2016).

Por lo tanto, el daño morfológico que se presenta en todos los tejidos no sólo se debe a la obstrucción total o parcial con HA, si no al fenómeno trombótico agudo que éste ocasiona. En nuestro estudio se observó una mejoría macroscópica en el modelo tratado con 500UI HYAL, similar a los estudios realizados por Kim *et al.*, (2011) donde se observó una mejoría macroscópica en el modelo tratado con una Dosis Alta de HYAL SC⁽²¹⁾.

A la fecha, no existe un estudio similar al nuestro en donde se evalúen distintas dosis de HYAL SC sobre un modelo con características morfológicas similares al sitio de aplicación de este relleno y los tejidos circundantes a la arteria.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES, CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

- Se estableció un modelo lagomorfo de embolismo por HA con mayor similitud morfológica al sitio clínico de aplicación.
- Se caracterizaron los cambios morfológicos en la arteria y tejidos circundantes ocasionados por el embolismo.
- Se determinó que con una Dosis Alta (500UI) de HYAL SC se reducen parcialmente los daños ocasionados por el embolismo en la arteria y sus tejidos adyacentes.
- Se determinó que una Dosis Alta (500UI) de HYAL SC no causa alteraciones en los tejidos adyacentes ni en la piel.

CONTRIBUCIONES

- Se estableció un nuevo modelo lagomorfo de embolismo por HA con mayor similitud al sitio clínico de aplicación de este tipo de relleno facial.
- Se describieron las características histopatológicas arteriales y de los tejidos adyacentes a la arteria en el nuevo modelo de embolismo.
- Se estableció la presencia de trombosis arterial en el modelo, y se destaca la importancia de utilizar una terapia trombolítica combinada con una Dosis Alta de HYAL SC.

PERSPECTIVAS

- Evaluar en el mismo modelo de embolismo por HA dosis mayores de HYAL SC.
- Realizar ligadura en la arteria femoral para evitar la migración del émbolo de HA a sitios distales fuera de la toma de muestra. Así como considerar

suturar la arteria femoral en el sitio de punción para evitar la fuga del relleno facial.

- Realizar estudios con dosis mayores de HYAL, así como terapia trombolítica combinada con HYAL.
- Evaluar la frecuencia de aplicación de dosis altas de HYAL en un modelo de embolismo por HA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2007;60(10):1110–9.
2. Anderegg U, Simon JC, Averbek M. More than just a filler – the role of hyaluronan for skin homeostasis. *Exp Dermatol*. 2014;23(42):295–303.
3. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. A key molecule in skin aging hyaluronic acid. *Dermatoendocrinol*. 2012;4(3):253–8.
4. Pawlina W, Michael H. Ross P. *Histología Texto y Atlas Correlación con biología celular y molecular* [Internet]. 2015. 1071 p. Available from: file:///C:/Users/Estudiantes/Downloads/Histología - Texto y atlas a color con biología celular y molecular - 7a edición (Ross, M. y Pawlina, W.).pdf
5. Kuo JW. Practical aspects of hyaluronan based medical products. CRC/Taylor & Francis; 2006. 217 p.
6. Juhlin L. Hyaluronan in skin. *J Intern Med*. 1997;242:61–6.
7. Reed RK, Lilja K, Laurent TC. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiol Scand*. 1988;134:405–11.
8. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):528–39.
9. Bailey SH, Fagien S, Rohrich RJ. Changing Role of Hyaluronidase in Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133:127–32.
10. Manna F, Dentini M, Desideri P, De Pita O, Mortilla E, Maras B. Comparative chemical evaluation of two commercially available derivatives of hyaluronic acid (Hylaform® from rooster combs and Restylane® from streptococcus) used for soft tissue augmentation. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 1999;13(3):183–92.
11. Zeilke HM, Wölber LM, Wiest LM, Rzany BM. Risk Profiles of Different Injectable

- Fillers: Results from the Injectable Filler Safety Study (IFS Study). *Dermatologic Surg.* 2008;34:326–35.
12. Maytin E V. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology.* 2016;26(6):553–9.
 13. Carruthers A, Carey W, DeLorenzi C, Remington K, Schachter D, Sapra S. Randomized, double-blind comparison of the efficacy of two hyaluronic acid derivatives, restylane perlane and hylaform, in the treatment of nasolabial folds. *Dermatol Surg [Internet].* 2005;31(11 Pt 2):1591–8; discussion 1598. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16416643>
 14. Kablik J, Monheit GD, Yu LP, Chang G, Gershkovich J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surg.* 2009;35(SUPPL. 1):302–12.
 15. ISAPS. The international study on aesthetic/cosmetic procedures performed in 2016. 2016;105.
 16. Weinberg MJ, Solish N. Complications of hyaluronic acid fillers. *Facial Plast Surg.* 2009;25(5):324–8.
 17. Park TH, Seo SW, Kim JK, Chang CH. Clinical experience with Hyaluronic acid-filler complications. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg [Internet].* 2011;64(7):892–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2011.01.008>
 18. Hirsch RJ, Brody HJ, Carruthers JDA. Hyaluronidase in the office: A necessity for every dermasurgeon that injects hyaluronic acid. *J Cosmet Laser Ther.* 2007;9(3):182–5.
 19. Maruyama S. A Histopathologic Diagnosis of Vascular Occlusion After Injection of Hyaluronic Acid Filler: Findings of Intravascular Foreign Body and Skin Necrosis. *Aesthetic Surg J [Internet].* 2017;1–7. Available from: <https://academic.oup.com/asj/article-lookup/doi/10.1093/asj/sjx085>

20. Cohen JL, Biesman BS, Dayan SH, DeLorenzi C, Lambros VS, Nestor MS, et al. Treatment of hyaluronic acid filler-induced impending necrosis with hyaluronidase: Consensus recommendations. *Aesthetic Surg J*. 2015;35(7):844–9.
21. Kim DW, Yoon ES, Ji YH, Park SH, Lee B II, Dhong ES. Vascular complications of hyaluronic acid fillers and the role of hyaluronidase in management. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* [Internet]. 2011;64(12):1590–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2011.07.013>
22. Kassir R, Kolluru A, Kassir M. Extensive necrosis after injection of hyaluronic acid filler: Case report and review of the literature. *J Cosmet Dermatol*. 2011;10(3):224–31.
23. Glaich AS, Cohen JL, Goldberg LH. Injection necrosis of the glabella: Protocol for prevention and treatment after use of dermal fillers. *Dermatologic Surg*. 2006;32(2):276–81.
24. Beleznay K, Humphrey S, Carruthers JDA, Carruthers A. Experience with 12 Cases and Recommendations. Injection age of time of complications management. 2014;7(9).
25. Abduljabbar MH, Basendwh MA. Complications of hyaluronic acid fillers and their managements. *J Dermatology Dermatologic Surg* [Internet]. 2016;20(2):100–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352241016000050>
26. Delorenzi C. Transarterial Degradation of Hyaluronic Acid Filler by Hyaluronidase. *Dermatologic Surg*. 2014;832–41.
27. Lee A, Grummer SE, Kriegel D, Marmur E. Hyaluronidase. *Dermatologic Surg*. 2010;36(7):1071–7.
28. Landau M. Hyaluronidase Caveats in Treating Filler Complications. *Dermatologic Surg*. 2015;41:S347–53.

29. DeLorenzi C. New High Dose Pulsed Hyaluronidase Protocol for Hyaluronic Acid Filler Vascular Adverse Events. *Aesthetic Surg J* [Internet]. 2017;1–12. Available from: <https://academic.oup.com/asj/article-lookup/doi/10.1093/asj/sjw251>
30. Chiang C, Zhou S, Liu K. Intravenous Hyaluronidase with Urokinase as Treatment for Arterial Hyaluronic Acid Embolism. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2016;137(1):114–21. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006534-201601000-00023>
31. Vartanian AJ, Frankel AS, Rubin MG. Injected hyaluronidase reduces restylane-mediated cutaneous augmentation. *Arch Facial Plast Surg* [Internet]. 2005;7(4):231–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16027343>
32. Zhuang Y, Yang M, Liu C. An Islanded Rabbit Auricular Skin Flap Model of Hyaluronic Acid Injection-Induced Embolism. *Aesthetic Plast Surg*. 2016;40(3):421–7.
33. Wang M, Li W, Zhang Y, Tian W, Wang H. Comparison of Intra-arterial and Subcutaneous Testicular Hyaluronidase Injection Treatments and the Vascular Complications of Hyaluronic Acid Filler. *Dermatologic Surg* [Internet]. 2017;43(2):246–54. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00042728-201702000-00011>
34. Wattanakrai P, Jurairattanaporn N, Rojhirunsakool S, Visessiri Y, Suwanchinda A, Thanasarnaksorn W. The study of histological changes of the arterial vascular structure after hyaluronidase exposure. *J Cosmet Dermatol* [Internet]. 2018;(June):1–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jocd.12719>

APÉNDICE A

A.1 Técnica histológica.

1. Obtener la muestra.
2. Fijar con formalina al 10 %.
3. Lavar en agua corriente.
4. Deshidratar en alcoholes graduales del 60 al 100 %.
5. Aclarar con xilol.
6. Preincluir en parafina.
7. Incluir en parafina.
8. Obtener los cortes histológicos usando un microtomo.
9. Adherir los cortes en el baño de flotación.
10. Desparafinar e hidratar.
11. Teñir.
12. Deshidratar y aclarar.
13. Montar el cubreobjetos añadiendo resina sintética.

A.2 Tinción con Hematoxilina y Eosina.

1. Desparafinar los cortes con xilol por 5 min.
2. Hidratar con etanol-xilol por 5 min.
3. Hidratar con etanol absoluto y alcohol etílico 96° por 2 min c/u
4. Enjuagar lentamente con agua destilada.
5. Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill, 4 min.
6. Enjuagar lentamente en agua de la llave (2 lavados).
7. Sumergir rápidamente en alcohol-ácido (1 inmersión).
8. Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
9. Sumergir rápidamente en agua amoniacal (2 inmersiones).
10. Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
11. Enjuagar lentamente con agua destilada.
12. Sumergir los cortes en eosina (6 inmersiones).
13. Deshidratar con alcohol etílico 96° (2 cambios) 2 min c/u.
14. Sumergir en etanol absoluto (2 cambios) 2 min c/u.

15. Sumergir en etanol-xilol 3 min.
16. Sumergir en xilol (2 cambios) 2 min c/u.
17. Montar con resina sintética.

A.3 Método Tricrómico de Masson.

1. Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100 % y agua destilada.
2. Usar como “mordente” el fijador de Bouin por 30-60 min a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente.
3. Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
4. Enjuagar los cortes en agua destilada.
5. Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min.
6. Lavar en agua corriente, 3 cambios de 15 s.
7. Enjuagar en agua destilada.
8. Teñir con la solución de fucsina-escarlata por 5 s (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso o de preparación del colorante).
9. Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
10. Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
11. Teñir con la solución de azul de anilina durante 15 s (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso del reactivo).
12. Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante.
13. Pasar al ácido acético 1% por 2 min.
14. Deshidratar en alcohol de 96° por unos segundos (cuidar que no se decolore).
15. Continuar con el alcohol absoluto hasta acarar en xilol y montar en resina.

A.4 Método de Orceína

1. Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100%.
2. Sumergir los cortes en solución de orceína a 37°C por 30 min.
Determinar el tiempo de coloración mediante observaciones periódicas bajo el microscopio.
3. Enjuagar en agua destilada.
4. Deshidratar aclarar y montar.

A.5 Método histoquímico de Azul Alcían pH1.

1. Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100% y agua destilada.
2. Sumergir los cortes en ácido acético 3% por 5min.
3. Sumergir los cortes en Azul Alcían por 50 min, revisar el color azul.
4. Lavar en agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante.
5. Enjuagar brevemente en agua destilada.
6. Deshidratar en alcoholes graduales hasta alcohol absoluto.
7. Aclarar en xilol y montar en resina.

APÉNDICE B

SOLUCIONES:

ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

B.1 Solución de formalina amortiguada 10 %

Para preparar 1L

Formaldehído 37%	270.27ml
------------------	----------

PBS 1X	729.73ml
--------	----------

Mezclar durante 15 min.

B.2 PBS 1X

Para preparar 1L

Tabletas Sigma Aldrich -Phosphate Buffered Saline ® (P4417)	5 tabletas
---	------------

Agua destilada	1L
----------------	----

Mezclar hasta disolver tabletas.

B.3 Hematoxilina de Gill.

Agua destilada	730ml
----------------	-------

Etilenglicol	250ml
--------------	-------

Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0g
------------------------------	------

Si está en cristales pesar	2.36g
----------------------------	-------

Yodato de sodio	0.2g
-----------------	------

Sulfato de aluminio	17.6g
---------------------	-------

Ácido acético glacial	2.0ml
-----------------------	-------

Seguir el orden, agitar a TA por 1h, filtrar antes de usar por primera vez.

B.4 Eosina.

Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0g
Agua destilada	20ml
Alcohol 96º	80ml

Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregar en tres partes de alcohol de 80°C. Antes de usar agregar 0.5 ml de ácido acético glacial, por cada 100 ml de colorante preparado y agitar.

B.5 Solución de alcohol-ácido.

Alcohol 70%	99ml
Ácido Clorhídrico (HCl)	1ml

B.6 Solución de agua amoniacal.

Agua destilada	99ml
Hidróxido de Amonio	1ml

B.7 Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1g
Alcohol 96%	100ml

Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4ml
Agua destilada	95ml
Ácido clorhídrico	1ml

Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y consistencia, precipita con el tiempo).

Solución de Cloruro Férrico 29%

Cloruro férrico	14.5 g
Agua destilada	50ml

B.8 Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich.

Escarlata de Biebrich al 1%	90ml
Fucsina ácida al 1 %	10ml
Ácido acético glacial	1ml

Solución de escarlata de Biebrich

Escarlata de Biebrich	1g
Agua destilada	100 ml

Solución de fucsina ácida

Fucsina ácida	1 g
Agua destilada	100ml

B.9 Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.

Ácido Fosfomolibdico	5g
Ácido Fosfotúngstico.	5g
Agua destilada	200ml

B.10 Solución de azul de anilina.

Azul de anilina	2.5g
Agua destilada	100ml
Ácido acético glacial	2ml

B.11 Solución acuosa de ácido acético al 1%.

Ácido acético glacial	1 ml
Agua destilada	99ml

B.12 Solución fijadora de Bouin

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 ml
Formaldehído (36-38%)	25ml
Ácido acético glacial	5 ml

B.13 Solución de Orceína

Orceína sintética	1g
Alcohol 70%	100ml
Ácido clorhídrico	1ml

Disolver la orceína en alcohol a fuego lento, dejar enfriar y después filtrar.
Después se añade el ácido clorhídrico.

B.14 Solución de Azul Alcian

Azul Alcian	0.5 g
Ácido acético al 3% en agua destilada	50 ml

Filtre y añada un cristal de Timol como conservador.

B.15 Solución acuosa de ácido acético 3%

Ácido acético glacial	3 ml
Agua destilada	97ml